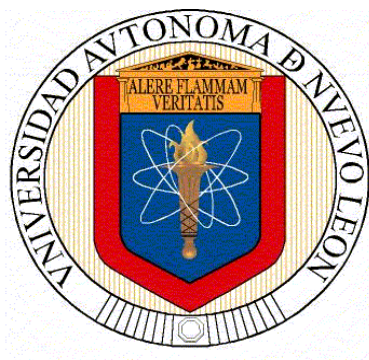


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO
CANINO UTILIZANDO UNA LÍNEA CELULAR B16F10 PARA LA
DETECCIÓN DE MELANOMA EN UN MODELO MURINO**

POR
RAÚL ABREU AGUIRRE ALBERTO

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Octubre, 2020.

EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO CANINO
UTILIZANDO UNA LÍNEA CELULAR B16F10 PARA LA DETECCIÓN
DE MELANOMA EN UN MODELO MURINO

Comité de Tesis



Presidente
Dra. Diana Elisa Zamora Avila



Secretario
Dr. Pablo Zapata Benavidez



Vocal
Dr. Gustavo Moreno Degollado



Vocal
MC. Andrea González Báez



Vocal
MVZ. Eduardo Martínez Arriaga

EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO CANINO
UTILIZANDO UNA LÍNEA CELULAR B16F10 PARA LA DETECCIÓN
DE MELANOMA EN UN MODELO MURINO

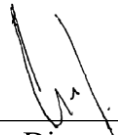
Dirección de tesis



Director
Dra. Diana Elisa Zamora Avila



Director externo
Dr. Pablo Zapata Benavides



Co-Director
Dr. Gustavo Moreno Degollado



Co-Director
M.C. Andrea González Báez



Co-Director
MVZ. Eduardo Martínez Arriaga

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la maestría, y seguir impulsando el desarrollo científico en el país.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme ser parte de la maestría en Ciencia Animal, la financiación y el apoyo logístico para llevar a cabo este proyecto de investigación.

A mi directora de tesis la Dra. Diana Elisa Zamora Avila por aceptarme como su estudiante de maestría, instruirme y guiarme durante estos dos años. Al Dr. Pablo Zapata Benavides por sus críticas constructivas que enriquecieron y moldearon el proyecto. A la Dra. Andrea González Báez y el Dr. Gustavo Moreno Degollado por su apoyo y tiempo brindado así como a los miembros de manada K-9 por ser parte fundamental de la realización de la tesis.

A mis maestros de maestría, por abrirme un nuevo panorama de oportunidades en el área de la investigación así como también por reavivar mi pasión por la ciencia, tomo lo mejor de cada uno de ellos.

A mis compañeros de maestría, no pude haber pedido mejor grupo que este, todos son excelentes personas, dedicadas y muy agradables. Espero haber dejado huella en ellos y me llevo los bonitos momentos que pasamos en estos 2 años, muchas gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación no fue un trabajo sencillo de realizar, hubo tropiezos y obstáculos en su proceso que debieron ser superados. Esto habría sido difícil de no ser por el apoyo de mis padres y pareja a quienes dedico esta tesis.

A mis padres por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento para seguir preparándome profesionalmente. Son unas excelentes personas, a las que admiro mucho, cuyos consejos y valores me han dirigido en la vida.

A mi pareja Lorena del Carmen Álvarez Hernández por sus buenos deseos y por ser parte de mi motivación para ser mejor persona cada día, sé que no fue sencillo tomar la decisión de separarnos para cumplir esta meta, pero siempre estuviste ahí para darme esas palabras de ánimo en momentos de flaqueza.

ÍNDICE

PORTADA.....	i
HOJA DE FIRMAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.1.1 Genes del cáncer	3
2.2 Características distintivas del cáncer.....	3
2.3 Características facilitadoras y emergentes.....	5
2.3.1 Características facilitadoras	5
2.3.2 Características emergentes.....	6
2.4 Melanoma	6
2.4.1 Definición	6
2.4.2 Epidemiología.....	6
2.4.3 Factores de riesgo	7
2.4.4 Diagnóstico	8
2.5 Uso de perros como biodetectores.....	9
2.6 Sentido del olfato canino	10
2.6.1 Anatomía.....	10
2.6.2 Fisiología de la olfacción.....	12
2.7 Compuestos volátiles orgánicos	14
2.8 Compuestos orgánicos volátiles y el cáncer.....	14

2.9 Perros detectores de cáncer	16
2.9.1 Primeros estudios en biodetección de cáncer por perros	17
2.9.2 Estudios previos en biodetección de cáncer de piel.....	18
2.9.3 Estudios previos en biodetección de cáncer urológicos.....	18
2.9.4 Estudios previos en biodetección de cáncer colorrectal.	20
2.9.5 Estudios previos en biodetección de cáncer de mama.	20
2.9.6 Estudios previos en biodetección de cáncer ovárico y cervical.....	21
2.9.7 Estudios previos en biodetección de cáncer pulmonar	22
2.9.8 Estudios previos en biodetección de cáncer a través del cultivo celular	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO GENERAL:	28
5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:.....	28
6. MATERIALES Y METODOS	29
6.1 Cultivo de la línea celular B16F10.....	29
6.2 Modelo <i>in vivo</i>	29
6.3 Muestras biológicas de heces y orina	29
6.4 Perros	30
6.5 Entrenamiento	30
6.5.1 Fase de inducción.....	31
6.5.2 Fase de fijación	32
6.5.3 Fase de discriminación.....	34
6.6 Prueba de detección de melanoma en un modelo <i>in vitro</i>	35
6.7 Entrenamiento para la prueba del modelo murino	36
6.8 Prueba de detección de melanoma en un modelo murino	37
6.8.1 Configuración experimental de la 1ra prueba <i>in vivo</i>	37
6.8.2 Configuración experimental 2da Prueba <i>in vivo</i>	37
6.8.3 Configuración experimental prueba con muestras biológicas de heces y orina	37
6.9 Análisis de datos.....	38
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Resultados del protocolo de entrenamiento y fases de evaluación.	40

7.1.2 Evaluación del entrenamiento en un modelo <i>in vitro</i>	41
7.2 Evaluación en un modelo murino del protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 basado en el método de entrenamiento utilizado para perros de detección operativos	43
7.2.1 Primera prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Cheeto) ...	43
7.2.2 Segunda prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Cheeto) ..	44
7.2.3 Primera prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Coyota) ...	45
7.2.4 Segunda prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Coyota) ..	46
7.3 Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas de orina y heces	48
7.3.1 Primera prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Coyota) .	48
7.3.2 Segunda prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Coyota)	49
7.3.3 Primera prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Cheeto) .	50
7.3.4 Segunda prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Cheeto)	51
7.3.5 Comparación de sensibilidad de la primera prueba en la detección de melanoma en el modelo <i>in vitro</i> , modelo <i>in vivo</i> y muestras biológicas	52
7.4 Establecimiento del protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 para la detección de melanoma <i>in vivo</i> basado en los resultados obtenidos...	53
7.4.1 Perros	53
7.4.2 Instrumentos.....	53
7.4.3 Muestras para entrenamiento	53
7.4.4 Número de cajas necesarias para el entrenamiento	53
7.4.5 Duración y almacenamiento de las muestras	54
7.4.6 Preparación y manejo de las muestras	54
7.4.7 Controles y distractores	55
7.4.8 Entrenamiento	55
7.4.9 Fase de inducción.....	55
7.4.10 Criterio para pasar a la siguiente fase	56
7.4.11 Fase de fijación.	56
7.4.12 Ejercicios de especificidad.....	57
7.4.13 Criterios para pasar a la fase de discriminación	57
7.4.14 Fase de discriminación.....	57
7.4.15 Última etapa de la fase de discriminación	58
8. DISCUSIÓN	60

9. CONCLUSIONES	65
10. BIBLIOGRAFIA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Fases completadas	40
Tabla 2. Identificación de melanoma in vitro (Cheeto)	41
Tabla 3. Identificación de melanoma in vitro (Coyota)	42
Tabla 4. Identificación de melanoma en un modelo murino (Cheeto)	43
Tabla 5. Identificación de melanoma en un modelo murino 2da prueba (Cheeto)..	44
Tabla 6. Detección de melanoma en un modelo murino (Coyota)	45
Tabla 7. Detección de melanoma en un modelo murino 2da prueba (Coyota)	46
Tabla 8. Comparación de sensibilidad y especificidad de Cheeto y Coyota	47
Tabla 9. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas (Coyota)	48
Tabla 10. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas 2da prueba (Coyota).....	49
Tabla 11. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas (Cheeto)	50
Tabla 12. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas 2da prueba (Cheeto)	51
Tabla 13. Comparación de sensibilidad en la identificación de melanoma entre los diferentes modelos	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Habilidades adquiridas del cáncer.....	4
Figura 2. Anatomía de la cavidad nasal.....	11
Figura 3. Perros.....	30
Figura 4. Recipiente con muestra objetivo.....	31
Figura 5. Jazz señalando muestra objetivo en la fase de inducción.....	32
Figura 6. Recipiente con tapa	33
Figura 7. Muestra control medio DMEM en caja Petri.....	35
Figura 8. Coyota señalando muestra objetivo en la prueba <i>in vitro</i>.....	36

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
ALT	Alargamiento alternativo de telómeros
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
Camp	Adenosín monofosfato cíclico
CRC	Cáncer colorrectal
CSLM	Microscopía laser de escaneo confocal
DMEM	Dulbeco Modified Eagle's Medium
EMT	Transición epitelio mesénquima
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GC-MS	Cromatografía de gases / espectrometría de masas
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
OR	Receptores olfatorios
Ppb	Partes por billón
Ppm	Partes por millón
Ppt	Partes por trillón
ORC	Células receptoras olfatorias
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCLC	Cáncer pulmonar de células pequeñas
TCC	Carcinoma de células del tracto urinario
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VNO	Órgano vomeronasal
VOCs	Compuestos volátiles orgánicos

RESUMEN

La capacidad del olfato canino para detectar cáncer se basa en la identificación de compuestos volátiles a través de diversos tipos de muestras de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, estos varían debido a la edad, dieta, sexo, condición fisiológica... de los pacientes; esto vuelve más difícil el proceso de entrenamiento de los perros al convertirse estas en variables que pudieran afectar la percepción del aroma. Las líneas celulares podrían limitar los factores relacionados con el origen de la muestra. El objetivo del presente estudio fue evaluar un protocolo de entrenamiento canino utilizando la línea celular B16F10 para la detección de melanoma en un modelo murino. 2 perros (Cheeto y Coyota) fueron capaces de completar el protocolo de entrenamiento; una vez completado, se realizaron 2 pruebas para determinar la capacidad de los perros para identificar el olor en un ratón con una masa tumoral grande versus un ratón sano, Cheeto en la primera ronda no señaló al ratón enfermo, pero mostraba interés, Coyota también mostró esta conducta. En las siguientes rondas de esa misma prueba Cheeto obtuvo una sensibilidad total de 30% y Coyota del 42%. En la segunda prueba Cheeto consiguió una sensibilidad del 100% y Coyota del 50%. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que existen compuestos volátiles que se comparten entre las células cultivadas en laboratorio y el melanoma desarrollado a partir de la inoculación. Los resultados de las pruebas con las muestras biológicas de heces y orina mostraron un patrón similar, en la primera prueba Cheeto consiguió una sensibilidad del 0% y 30% para heces y orina respectivamente y Coyota 0% y 25%. En la segunda prueba los resultados fueron 70% y 60% para Cheeto en heces y orina respectivamente y Coyota 10% y 0%. Por consiguiente asumimos que la línea celular y las muestras biológicas emiten señales volátiles en común que le permiten al perro discriminarlas, no obstante, los resultados de las primeras pruebas apuntan que el cambio espontáneo de la matriz en la que se encuentran provoca duda y titubeos al señalar las muestras de ratones con cáncer. Aun así, no recomendamos al igual que en el modelo *in vivo* un cambio radical y repentino de muestras objetivo para la identificación de melanoma murino con perros entrenados con la línea celular.

ABSTRACT

The ability of the canine olfactory system to detect cancer is based on the identification of volatile compounds through various types of samples of different types of cancer. However, these vary due to the age, diet, sex, physiological condition... of the patients; this makes the training process of the dogs more difficult as these become variables that could affect the perception of aroma. Cell lines may limit factors related to the origin of the sample. The objective of the present study was to evaluate a canine training protocol using the B16F10 cell line for the detection of melanoma in a murine model. Two dogs (Cheeto and Coyota) were able to complete the training protocol; once completed, two tests were performed to determine the dogs' ability to identify odor in a mouse with a large tumor mass versus a healthy mouse, Cheeto in the first round did not signal the sick mouse, but showed interest, Coyota also showed this behavior. In the following rounds of that same test Cheeto obtained a total sensitivity of 30% and Coyota of 42%. In the second test Cheeto obtained a sensitivity of 100% and Coyota of 50%. Therefore, these findings suggest that there are volatile compounds that are shared between the cells cultivated in the laboratory and the melanoma developed from the inoculation. The results of the tests with the biological samples of feces and urine showed a similar pattern, in the first test Cheeto obtained a sensitivity of 0% and 30% for feces and urine respectively and Coyota 0% and 25%. In the second test the results were 70% and 60% for Cheeto in feces and urine respectively and Coyota 10% and 0%. Therefore we assume that the cell line and the biological samples emit common volatile signals that allow the dog to discriminate them, however, the results of the first tests indicate that the spontaneous change of the matrix in which they are found causes doubt and hesitation when pointing out the samples of mice with cancer. Even so, we do not recommend as in the *in vivo* model a radical and sudden change of objective samples for the identification of murine melanoma with dogs trained with the cell line.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles son actualmente responsable de la mayoría de las muertes a nivel global, pero se espera que el cáncer ocupe ese lugar liderando la mayor causa de muerte y la barrera más importante para incrementar la esperanza de vida en cada país del mundo en el siglo XXI (Bray et al., 2018).

Melanoma es una neoplasia habitualmente pigmentada de la piel, que representa un riesgo grave de muerte cuando no es diagnosticado en forma temprana (Ochoa et al., 2005). Existen métodos establecidos de detección como son la autoexploración y dermatoscopia, sin embargo, un diagnóstico preciso y temprano se mantiene aún difícil, no obstante, nuevas herramientas se encuentran en desarrollo para mejorar las habilidades diagnósticas, una de estas nuevas herramientas es el uso de perros como detectores de melanoma (Ferris & Harris, 2012)

De acuerdo con Buljubasic & Buchbauer, (2015) los desechos metabólicos del cáncer tienen un olor específico, este olor es producido por compuestos orgánicos volátiles (VOC's) que son eliminados a través de orina, heces, aliento, sudor, saliva y que el perro entrenado es capaz de detectar.

Williams & Pembroke (1989) documentaron por primera vez la capacidad de los perros para identificar estos olores específicos del cáncer, y desde entonces se ha desafiado esta capacidad para convertirla en un noble método de detección de cáncer.

El entrenamiento de los perros depende sustancialmente del tipo de muestra que se utilice al momento de inducir un aroma, en la mayoría de los estudios previos se utilizaron muestras biológicas (orina, heces y aliento) de pacientes con cáncer como muestras objetivo (Pirrone & Albertini, 2017), pero no existe una estandarización o un sesgo riguroso para los pacientes de los que se obtienen dichas muestras, por lo que existen diferentes tipos de VOCs que se originan del discrepante tipo de alimentación, estilo de vida, estado fisiológico, edad, sexo de cada paciente y que se convierten en factores de confusión para el perro .

El uso de líneas celulares ofrece varias ventajas para el estudio del cáncer, como fácil manejo, representa una fuente autoreplicante ilimitada que puede crecer casi en cantidades

infinitas y además muestran un relativamente alto grado de homogeneidad (Burdall et al., 2003), por lo que reúne características para ser utilizadas como muestras objetivo en el entrenamiento.

Estudios que evalúen el entrenamiento de perros con líneas celulares para la detección de cáncer es limitado a pesar de los beneficios en cuanto a tiempo y costos que esto implica. En este estudio nuestro objetivo fue entrenar a 3 perros utilizando un protocolo de detección de melanoma basado en el uso de la línea celular B16F10 para después evaluar si este entrenamiento se traducía en una identificación de melanoma en un modelo *in vivo* y con muestras biológicas de orina y heces de ratones con cáncer. Esto representaría un paso importante en los métodos de entrenamiento de perros detectores de cáncer.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad causada por células anormales incapaces de formar estructuras funcionales estables, las cuales se multiplican descontroladamente e invade el organismo. Poblaciones de células cancerígenas o sus modelos *in vitro*, exhiben muchas características biológicas y bioquímicas algunas son comunes para la mayoría de los cánceres, y otras son particulares para distintos tipos de tumores (Floor et al., 2012). Por lo tanto el cáncer no representa a una enfermedad sencilla y claramente definida, lo que comúnmente llamamos cáncer es en realidad un conjunto de enfermedades con tantas manifestaciones diferentes como tejidos y células existen en el cuerpo humano involucrando innumerables agentes carcinogénicos endógenos o exógenos y varios mecanismos etiológicos (Benjamin, 2010).

2.1.1 Genes del cáncer

El cáncer esta conducido por 2 clases de genes (oncogenes y genes supresores tumorales), cada uno de ellos desempeña una función esencial en células normales.

Oncogenes se derivan de versiones mutadas de genes celulares normales llamados proto-oncogenes que controlan la propagación, supervivencia y proliferación celular. La expresión de proto-oncogenes en condiciones normales está estrictamente regulada para evitar un crecimiento celular descontrolado. En cáncer, mutaciones en proto-oncogenes son responsables de división celular descontrolada, supervivencia mejorada (incluso cuando enfrenta tratamiento anti-cáncer) y diseminación (Harrington, 2016).

Genes supresores tumorales son genes celulares normales cuya función involucra la inhibición de la supervivencia, proliferación, progresión en el ciclo celular y la apoptosis. Genes supresores tumorales son fenotípicamente recesivos, debe existir pérdida de la función en ambas copias para que se promueva la aparición de cáncer (Harrington, 2016).

2.2 Características distintivas del cáncer

Aunque el cáncer se origina de diferentes tejidos y tipos de células, virtualmente todos los cánceres consisten en células que poseen las mismas características “distintivas”, las cuales fueron descritas por Hanahan & Weinberg (2000), ellos propusieron que el vasto

catálogo de genotipos celulares de cáncer es una manifestación de 6 alteraciones o capacidades en la fisiología celular que en conjunto provocan un crecimiento maligno (**Figura 1**).

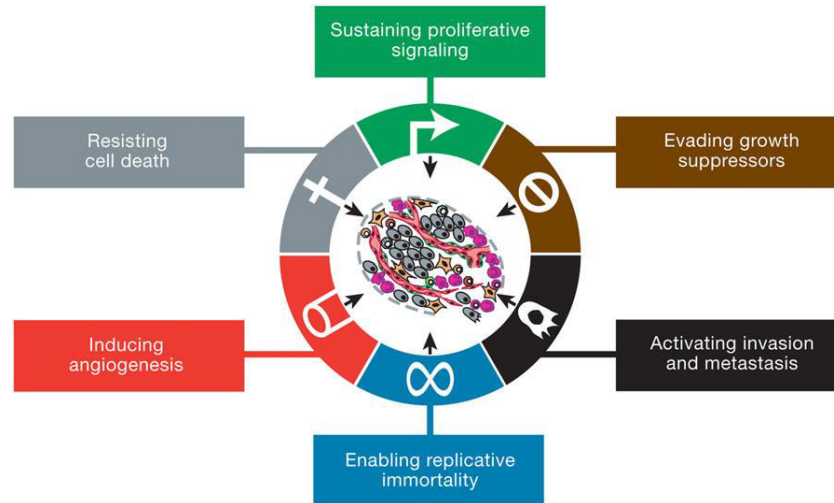


Figura 1. Habilidades adquiridas del cáncer

Autosuficiencia en señales de crecimiento; Existen 3 estrategias, la primera es produciendo sus propios factores de crecimiento, la segunda es la desregulación de los receptores de superficie volviendo hiperresponsiva a las células a niveles bajos de factores de crecimiento y por ultimo alteraciones en componentes de la cascada citoplasmática que reciben y procesan las señales de crecimiento emitidas por la activación de un ligando. En contraparte se tiene la **insensibilidad a señales anticrecimiento**, un defecto en la función o ausencia de genes supresores tumorales, en las células cancerígenas les permite persistencia en la proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2011). **Evasión de apoptosis**, las células cancerígenas pueden mantener ADN dañado sin causar muerte celular, por lo tanto, este mecanismo representa una herramienta muy poderosa para el desarrollo del cáncer (Harrington, 2016). **Angiogénesis mantenida**, en la actualidad se considera al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y a sus receptores como reguladores de la construcción de vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando estos se encuentran alterados estos procesos no se regulan de manera adecuada y pueden contribuir al crecimiento de tumores malignos (Martínez et al., 2006). **Inmortalización celular** en la mayoría de los tumores, esto ocurre a través de la regulación de la enzima telomerasa,

pero en 10-15 % de los casos un mecanismo diferente llamado alargamiento alternativo de telómeros (ALT) es el responsable, Tumores que han reactivado la expresión de telomerasa reconstruyen las partes de sus telómeros que pierden en cada ciclo de la división celular y evitan entrar en la senescencia replicativa (Harrington, 2016). **Invasión a tejidos y metástasis** es un proceso biológico relacionado con la motilidad celular del tumor, intravasación, circulación en el sistema sanguíneo o linfático, extravasación, y crecimiento en nuevos tejidos y órganos. El aumento de la motilidad y la invasividad de las células tumorales metastásicas son un recordatorio de los eventos en la transición epitelio mesénquima (EMT). La activación de EMT normalmente latente le confiere a las células cancerígenas una ventaja para la invasión y metástasis a órganos o tejidos distantes (Wu & Zhou, 2009).

2.3 Características facilitadoras y emergentes

De nueva cuenta Hananah & Weinberg (2011), en su publicación describen 2 nuevas características así como las que hacen posible la aparición de las demás.

2.3.1 Características facilitadoras

Inestabilidad genómica incluye aumento de la frecuencia de mutaciones en pares de bases, inestabilidad de microsatélites, variaciones en el número de cromosomas, así como de cambios en su estructura (Yao & Dai, 2014). La otra característica es la **mutabilidad** la cual es lograda a través del incremento de la sensibilidad a agentes mutágenos, por medio de la ruptura en uno o varios de los componentes de la maquinaria del mantenimiento genómico (Jackson & Bartek, 2009). Y por último la **inflamación**, Dvorak (2015) publicó un ensayo titulado “Tumores: heridas que no sanan” en el que describe muchas de las similitudes que existen entre tumores sólidos y la cicatrización de heridas. La forma en que la inflamación contribuye a la tumorigénesis es suministrando moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento que mantienen una señalización de crecimiento, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos, enzimas que modifican la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis (DeNardo et al., 2010).

2.3.2 Características emergentes

Reprogramación del metabolismo energético, Warburg, (1931) fue el primero que observó una característica anómala del metabolismo energético de las células cancerígenas: incluso en la presencia de oxígeno, células cancerígenas pueden reprogramar su metabolismo de glucosa, y por lo tanto su producción de energía, este efecto sería posteriormente bautizado como “efecto Warburg”. De acuerdo a la hipótesis de Vander Heiden et al., (2009), la glucolisis aumentada permite la desviación de los intermediarios dentro de varias rutas biosintéticas, incluyendo aquellos que generan nucleósidos y aminoácidos; esto facilita la biosíntesis de las macromoléculas y organelos requeridos para formar nuevas células.

Evasión del sistema inmune, de acuerdo a la teoría de la inmunovigilancia, el sistema inmune monta una constante vigilia contra células malignas o premalignas emergentes. La ocurrencia de tumores puede ser percibida como una falla del sistema inmune en reconocer, rechazar y destruir células tumorales que expresen auto-antígenos alterados.

2.4 Melanoma

2.4.1 Definición

Es un tipo de cáncer piel que se origina en los melanocitos epidérmicos, dérmicos o del epitelio de mucosas. En el lugar afectado se produce una neoformación cutánea, plana, exofítica, tratable en etapas tempranas, pero si no se trata progresa rápidamente pudiendo provocar metástasis linfáticas o hematógenas lo que causa una alta mortalidad (Arenas, 2015).

2.4.2 Epidemiología

Melanoma se observa en mayor medida en personas con piel blanca. En el año 2012 se reportaron globalmente 230,000 nuevos casos y 55,000 muertes, de estos el 87 % de los nuevos casos se registraron en Europa, Norteamérica y Oceanía, en contraste África, India subcontinental y melanesia presentaron la menor incidencia de melanoma (Arnold et al., 2018).

Melanoma globalmente representa el 4% de los diagnósticos de cáncer, sin embargo, cuenta con el 75% de las muertes relacionadas con el cáncer de piel, con la tasa de prevalencia y mortalidad incrementándose a nivel mundial en las últimas décadas.

Pacientes con melanoma con metástasis distante tienen una tasa de supervivencia del 10%. Ha sido observado que las tasas más altas de mortalidad así como las pobres tasas de supervivencia ocurren en países con bajos ingresos económicos comparada con aquellas áreas de ingresos económicos altos (Schmerling et al., 2011).

En México, debido a que melanoma es una enfermedad que se manifiesta principalmente en pacientes con piel clara no se le ha dado la importancia que merece (Herrera & Aco, 2010), sin embargo, la situación en México es un reflejo de lo que sucede a nivel mundial, melanoma no representa el tipo de cáncer más frecuente, ocupa el lugar número 22 en el ranking de cáncer de mayor incidencia con 3,079 casos (GLOBOCAN, 2018); empero, su aumento en los últimos años se ha disparado de manera alarmante. En el 2005 un grupo de especialistas en el área de dermatología y oncología del INCAN (Instituto nacional de cancerología) reportaron en un estudio retrospectivo que esta neoplasia aumentó un 500% en los últimos 30 años (Martinez et al., 2004). El aumento de esta patología está íntimamente relacionada con la exposición inmoderada a la luz solar debido al mayor número de actividades al aire libre, un aumento de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre y por último los cambios en criterios diagnósticos, con mayor índice de sospecha en poblaciones que se traduce en mayores índices de detección de melanoma incluso en etapas tempranas (Rosa et al., 2007).

2.4.3 Factores de riesgo

Las causas de melanoma y los riesgos asociados son complejos, con factores genéticos y ambientales que afectan de forma individual (Azoury & Lange, 2014).

Varios factores han sido hipotetizados como responsables por el incremento mundial en la incidencia de melanoma. De estos, el mayor factor responsable para la mayoría de este incremento es la exposición desmedida a la radiación ultravioleta (UV), principalmente debido a la reducción de la capa de ozono, permitiendo la penetración de los rayos UV dentro de la atmosfera (Markovic et al., 2007).

Existen 2 grupos de alto riesgo para melanoma, el primero son individuos con piel blanca con cabello rojizo o rubio y muchas pecas; el segundo grupo son individuos con cabello negro con un gran número de nevus. Pacientes que tienen la piel más oscura son menos

fotosensibles que los individuos con pelo rojizo, piel más clara, y ojos azules, por lo tanto menos propensos (Azoury & Lange, 2014).

Conocer cuáles son los factores de riesgo en melanoma es vital para tomar decisiones en temas de salud pública y del paciente para poder reducir la incidencia de cáncer de piel (Mordoh, 2009).

2.4.4 Diagnóstico

La dermatoscopia como la describe Cura et al., (2018), es una herramienta diagnóstica no invasiva, de utilidad en el diagnóstico precoz del melanoma. El instrumento empleado en esta técnica se denomina dermatoscopio. Proporciona una imagen ampliada y más nítida que permite la observación y análisis de estructuras que no se aprecian fácilmente al examen clínico y evita tomar biopsias innecesarias de lesiones benignas. En la inspección de una lesión pigmentada hay 5 aspectos (ABCDE) a evaluar: asimetría, borde irregular, coloración, diámetro (mayor a 6 mm) y elevación. (Herrera & Aco, 2010).

A pesar de los avances en el desarrollo de herramientas diagnósticas como la dermatoscopia, la detección en etapas tempranas se ha mantenido como un gran desafío por lo que se necesitan mejorar los métodos de detección. Por ejemplo en el estudio realizado por Friedman et al., (2008), demostró que incluso para los dermatólogos más expertos sigue siendo un desafío poder diferenciar pequeñas lesiones de melanoma ($\leq 6\text{mm}$) de pequeñas lesiones benignas pigmentadas; ellos fueron capaces de identificar pequeños melanomas con una sensibilidad diagnóstica en promedio de 39% y una especificidad del 82%. Por otro lado Ferris & Harris., (2012), hablan sobre el número de biopsias de lesiones benignas realizadas para el diagnóstico de cáncer de piel, el cual puede variar considerablemente; en el extremo más bajo, un estudio en una clínica especializada en lesiones pigmentadas mostró una proporción de biopsia de alrededor 5:1 (5 lesiones benignas por cada una de melanoma).

Existen nuevos métodos de detección que tratan de subsanar las deficiencias de los métodos ya establecidos. La microscopía laser de escaneo confocal o por sus siglas en inglés (CSLM) es una tecnología que provee imágenes *in vivo* de la epidermis y de la dermis papilar en tiempo real (Meyer et al., 2006). No obstante una de las limitantes para

su implementación como un método ya establecido es el costo del dispositivo de alrededor de \$50,000 dólares.(Ferris & Harris, 2012).

A estos métodos se pueden sumar otras tecnologías de uso más reciente como la detección genómica, espectroscopia de impedancia eléctrica, difracción de rayos X, elastografía de tejidos, imagenología térmica. Ferris & Harris., (2012) concluyen que existen barreras significativas para su implementación las cuales deben ser superadas. Estas incluyen el tiempo, entrenamiento, y experiencia necesaria para usar apropiadamente muchas de estas tecnologías, costos asociados con el desarrollo y su adopción. Idealmente, las nuevas tecnologías deberían 1) tener especificidad y sensibilidad en comparación con las tecnologías actuales, 2) capaz de ser usado de tal manera que el tiempo empleado en el método diagnóstico sea equivalente o menor que el tiempo que toma para realizar una biopsia, 3) ser accesible para un amplio rango de pacientes y doctores, incluyendo no-dermatólogos. Uno de los métodos de uso reciente que cumple con las premisas anteriores de manera experimental es el uso de perros olfateadores como biodetectores.

2.5 Uso de perros como biodetectores

Por más de 100 años los perros olfateadores han sido utilizados como herramientas operacionales por fuerzas policíacas y servicios civiles alrededor del mundo (Lesniak et al., 2008), pero su uso como detectores químicos datan desde hace 12,000 años cuando eran usados como perros cazadores (Furton & Myers, 2001). Entre las tareas para perros olfateadores se incluyen encontrar personas perdidas o cuerpos humanos en desastres, rastreando e identificando sospechosos de crímenes, detección de drogas, explosivos, minas terrestres, contrabando y más recientemente para detectar marcadores de olor para enfermedades. Prácticamente, los perros pueden ser entrenados para detectar cualquier sustancia olorosa (Lesniak et al., 2008). La habilidad de los perros para localizar su aroma objetivo mientras ignoran los muchos otros aromas no-objetivo encontrados en su ambiente de búsqueda se reivindica como mejor que varios instrumentos, gracias a su especializado sentido del olfato (Furton & Myers, 2001).

2.6 Sentido del olfato canino

2.6.1 Anatomía

Los componentes más importantes del sistema olfatorio son la cavidad nasal, epitelio y receptores olfatorios, el órgano vomeronasal (VNO), y el bulbo olfatorio. La cavidad nasal está compuesta por 2 cámaras separadas por el septum nasal. Cada cámara de la cavidad nasal contiene 3 cornetes (nasal, maxiloturbinado, y etmoidal) que contribuye a incrementar el área de la superficie mucosa. Sin embargo, el área total de la superficie mucosa puede estar altamente influenciada por el tamaño y forma del hocico canino (Jenkins et al., 2018).

El epitelio olfatorio está compuesto de neuroepitelio que yace en la lámina cribosa, septum dorsal, y los cornetes medios y dorsales, y el epitelio columnar pseudoestratificado, con millones de receptores olfatorios (OR) y células receptoras olfatorias (ORC). La capa de mucosa mantiene los niveles de humedad nasal normales y atrapa odorantes. La percepción normal olfatoria depende de la humedad del área receptora (Hawkes & Doty, 2009).

ORC sobresalen directamente hacia el bulbo olfatorio, estas tienen cilios que tienen receptores de olor en la superficie, las ORC en humanos tienen aproximadamente 25 cilios por ORC, mientras que los perros tienen cientos de cilios por ORC, estos permiten la detección de concentraciones significativamente más pequeñas de odorantes en caninos. Hay más de 220 millones de ORs en la cavidad nasal canina, lo cual permite a gran número de odorantes unirse. Las neuronas olfatorias solo viven 30-60 días, pero a diferencia de las otras células sensoriales de mamíferos, las ORCs constantemente se regeneran. El número y tipo de ORCs presentes en un perro de forma individual están dictadas por la raza, genética y el entrenamiento (Uemura, 2015).

Las porciones extracelulares incrustadas en la membrana de los cilios de ORC se unen a los odorantes, y las porciones intracelulares acopladas a proteína G cuando un olor se une a la porción extracelular del receptor, la subunidad-A de la proteína G se rompe activando adenil-ciclase, la cual subsecuentemente convierte el ATP a cAMP. cAMP amplifica la señal entrante del olor activando múltiples canales de sodio, esto causa una despolarización, y el resultante potencial de acción es transmitido a través del bulbo

olfatorio. Cada olor es reconocido por una combinación única de ORs activados. La habilidad de los perros detectores para apropiadamente reconocer los olores recae en esta función (Furton et al., 2015).

El bulbo olfatorio es una estructura par, cuyas funciones es servir como una estación de parada, y filtrar la entrada sensorial. Hay aproximadamente 1,000 axones de ORC por cada neurona de segundo orden, resultando en una amplificación de la señal del olor. El bulbo olfatorio tiene un rol sensorial (procesamiento inicial de la información olfatoria) y un rol modulador en el cerebro anterior, hipotálamo, y sistema límbico. La ruta olfatoria de los caninos está demostrada en la **figura 2**.(Cain, 1974).

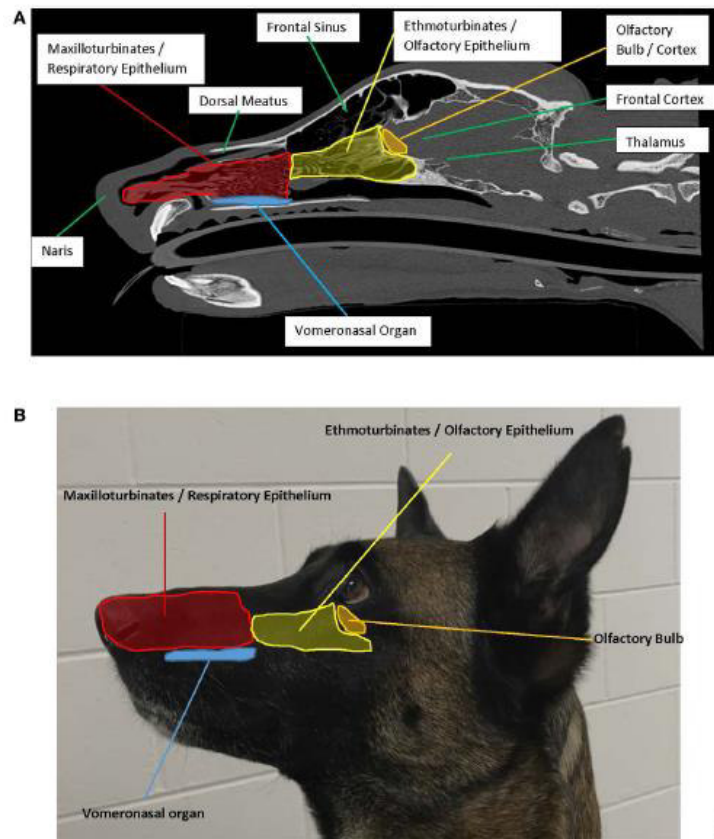


Figura 2. Anatomía de la cavidad nasal A) Plano sagital izquierdo resalta la anatomía asociada con la olfacción. B) Vista exterior izquierda muestra la ubicación de estructuras internas asociadas con la olfacción.

El sistema límbico es un conjunto de estructuras cerebrales que regulan el olfato, la memoria, el comportamiento y la motivación. Los componentes del sistema límbico incluyen el bulbo olfativo, hipocampo, amígdala y complejo entorrinal, entre otros. El

tamaño y la función del sistema límbico varían según la especie, pero en todas las especies el sistema límbico tiene componentes olfativos y no olfativos (Reep et al., 2007).

2.6.2 Fisiología de la olfacción.

En comparación con los humanos, los perros tienen una superficie significativamente más grande de epitelio olfatorio, con aproximadamente 30% más ORs que pueden reconocer una variedad mucho más grande de olores. Los perros también tienen una capacidad excelente para la localización del olor, incluso en presencia de otros olores, probablemente debido a una cavidad nasal más grande en comparación con otras especies y un patrón de flujo de aire único creado al olfatear (Barrios et al, 2014).

Los perros han mejorado la toma del flujo de aire y la colección del olor a través de un olfateo activo, el cual es la producción de aspiraciones cortas y rápidas, independientes del tamaño del cuerpo del canino. El aire es inhalado desde el frente y exhalado por los lados, esto permite mayor eficiencia en la colecta de olores. A diferencia de los humanos y otras especies micrósmicas, el aire no entra ni sale del hueco olfativo del perro durante la expiración, lo que da lugar a una exposición prolongada del aire inspirado a los quimiorreceptores del epitelio olfativo y a una estimulación olfativa continua durante todo el ciclo respiratorio (Craven et al., 2009).

Las condiciones ambientales, como la humedad relativa y la presión barométrica pueden tener repercusiones directas en el olfato, además de los efectos que esos factores tienen en la generación y el movimiento del propio olor. Los perros de búsqueda y rescate funcionan mejor cuando la humedad relativa es alta (Smith, 2008), potencialmente debido a la mejora en la humedad nasal y el atrapamiento de olores. Humedad, pero no lluvia, aumentó la eficiencia de los perros en las tareas de rastreo y búsqueda al aumentar la intensidad de los olores (Gutzwiller, 1990), y mejorar la detección olfativa de feromonas, lo que lleva a una mayor actividad de apareamiento durante la temporada de chubascos (Sen Majumder & Bhadra, 2015).

Los caninos se mueven más lentamente y el período de olfateo dura 3 veces más durante la fase decisiva del rastreo (el "hallazgo"), en comparación con la fase de búsqueda inicial y las fases de rastreo. Concha et al., (2014) demostraron que los patrones de olfateo en perros de trabajo puede ser usados para diferenciar respuestas verdaderos negativos de los

falsos negativos. Los perros detectores de olores entrenados pasan significativamente menos tiempo oliendo muestras verdaderas negativas (sin olor, sin repuesta de alerta), con solo un episodio de olfateo para muestras verdaderas negativas.

La olfacción y otras formas de aprendizaje/memoria están reguladas por las mismas reglas neurobiológicas. Los perros comienzan a aprender olores en el periodo prenatal, debido a la influencia de la dieta materna en la composición del líquido amniótico, pero la memoria de olor aprendida desaparece por las 10 semanas de edad. Se ha demostrado que tanto la olfacción y la cognición se deterioran conforme a la edad del perro, pero no existe edad específica en que los perros dejan de aprender. Williams & Johnston (2002) establecieron que los perros podrían fácilmente aprender y consecuentemente identificar 10 olores en una tarea de búsqueda. La durabilidad de la memoria en los olores entrenados no ha sido extensamente estudiada, sin embargo, Johnston (1999) demostró que en los perros detectores de explosivos no había deterioro sistemático en el desempeño de la detección en más de 4 meses. Los métodos de entrenamiento pueden tener influencia en la durabilidad de la memoria del olor, o en al menos en la señalización del perro hacia el manejador cuando un olor específico es detectado. Si las alertas no son reforzadas, o el perro realiza varias búsquedas sin detección del olor entrenado, la alerta o el comportamiento de búsqueda puede desaparecer. Aún no está claro, sin embargo, si la memoria es mantenida cuando la alerta o el comportamiento de búsqueda desaparece o cual es tiempo máximo en el que un canino puede mantener la memoria de olor sin entrenamiento (Jezierski, 2016).

El polimorfismo de los genes de OR puede tener impacto en la capacidad y sensibilidad olfatoria en razas e individuos. Tacher et al., (2005) señalaron que tanto el porcentaje de pseudogenes y la frecuencia de polimorfismo de genes específicos variaba de acuerdo a la raza, y especuló que los cambios genéticos pueden contribuir para diferenciar en las capacidades olfatorias entre razas e individuos. Esto puede dar una pista de las “líneas de trabajo”, dentro de algunas razas tienden a producir tasas más altas de éxito de detección que otras.

La literatura actual contiene información que se opone una a la otra sobre la capacidad olfatoria específica de cada raza. Jezierski et al., (2014) revelaron que los pastores

alemanes fueron significativamente mejores en la detección de narcóticos que los labradores o terriers. Por el contrario Hall et al., (2015) demostraron que los perros pugs superaron sistemáticamente a pastores alemanes y galgos en la adquisición olfativa y tareas de discriminación. Polgar et al., (2016) señalaron que los perros del “grupo de olor” (basset hound, german pointer, etc.) tuvieron un mejor desempeño en una tarea de detección natural que los perros del “grupo no-olor” (galgo inglés, el sabueso afgano, etc.) y los perros de hocico corto (cavalier king charles spaniel, Boston terrier, etc.). Se necesitan más investigaciones para concluir si las capacidades olfativas específicas de la raza están correlacionados con los polimorfismo genético o si el rendimiento olfativo es más una función de atributos de comportamiento como la motivación inherente (es decir el impulso) y la capacidad de entrenamiento (Jenkins et al., 2018).

2.7 Compuestos volátiles orgánicos

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) se componen por un amplio rango de moléculas químicas estables de diferentes clases con algunas propiedades como por ejemplo, bajo peso molecular, bajo punto de ebullición o alta presión de vapor en condiciones naturales los cuales son desechados y detectados en aliento, orina, heces y sudor. Este set completo de VOCs producido por un organismo es llamado volatiloма, y su nivel de expresión puede reflejar su estado metabólico (Lubes & Goodarzi, 2018).

Los olores del cuerpo humano son producidos por VOCs; estos son emitidos por diferentes áreas del cuerpo y pueden variar con la edad, dieta, sexo, condición fisiológica y posiblemente antecedentes genéticos. Por lo tanto, el olor del cuerpo puede ser considerado como una huella de olor individual (Shirasu & Touhara, 2011).

2.8 Compuestos orgánicos volátiles y el cáncer

Las rutas metabólicas alteradas asociadas a cáncer son conocidas actualmente como el “efecto Warburg”, lo que provoca un cambio en la producción de desechos metabólicos (Potter, Newport & Morten, 2016).

En un modelo fisiopatológico complementario, se establece que parte de la proliferación de células normales en tasas rápidas durante el desarrollo de cáncer en etapas tempranas la difusión de oxígeno se vuelve limitada y se convierte hipóxico (menos del 0.1 % del oxígeno en la fase gaseosa). Como resultado, algunas células cancerígenas muestran una

respiración mitocondrial dañada y una alta glicolisis para sobrevivir en el microambiente hipóxico, como se mencionó previamente en el efecto Warburg. En consecuencia de la excesiva producción de lactato (la cual ayuda a seleccionar células móviles) y las altas tasas de glicolisis, el tejido se acidifica. El microambiente acidificado permite la ruptura de la membrana basal y la accesibilidad a los vasos sanguíneos (Harrington, 2016).

Ha sido propuesto que procesos patológicos, tales como desordenes metabólicos y cáncer, pueden producir nuevos VOCs, o cambiar la proporción entre los VOCs que son producidos normalmente por el cuerpo, esta idea está basada en los principios de biología celular como el efecto de enzimas hepáticas sobre las membranas celulares, la cual consiste principalmente de fosfolípidos anfipáticos, carbohidratos y muchas proteínas integrales de membrana. En el estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) se escapan de la mitocondria o de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de las células y generan alcanos volátiles y alcanos metilados que son excretados en el aliento (Hakim et al., 2012).

El mecanismo común de todas estas lesiones tisulares es la interacción de ROS con componentes celulares tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La peroxidación de lípidos puede ser descrita generalmente como un proceso bajo el cual oxidantes tales como radicales libres o especies no-radicales atacan el doble enlace de carbono de los lípidos especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Ayala, Muñoz & Argüelles, 2014).

En este contexto, aldehídos específicos pueden ser producidos durante la peroxidación lipídica si AGPI están presentes en la membrana de células tumorales, revelando así la ruta bioquímica de estos VOCs liberados en el aliento exhalado de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Buljubasic & Buchbauer, 2015).

Janfaza et al., (2019) clasificaron los VOCs de cáncer de acuerdo a su grupo funcional en 5 principales grupos: Aldehídos (heptanal, hexanal, decanal, nonanal, pentanal y octanal), cetonas (acetona, 3-heptanona, 2-butanona y ciclohexanona), alcoholes (2-etilhexanol), hidrocarburos (dodecano, 3-metilhexano, 4-metiloctano y 2,2 dimetildecano) y compuestos aromáticos (1,2,4 trimetilbenceno, 1-metil-4-propeno-2-ylbenceno y p-xileno).

Los VOCs son liberados en concentraciones de ppb a ppt en el aliento humano, y ppm a ppb en sangre y orina de humanos (Angle et al., 2016). Walker et al., (2006) demostraron en su experimento que los perros pueden detectar *n*-amil-acetato en un rango de ppt, señalando que la mayoría de los VOCs en el volatiloema están dentro de las capacidades de detección del perro; esta afirmación respalda el empleo de los perros como detectores de aromas biológicos.

2.9 Perros detectores de cáncer

El primer reporte sobre un perro que fue capaz de reconocer una lesión de melanoma (el cáncer de piel más letal) fue hecho por Williams & Pembroke (1989) a la revista THE LANCET. En el reporte se indica que una perra cruza entre border collie y doberman constantemente olfateaba por varios minutos al día una mancha en el muslo izquierdo de su dueña, mientras ignoraba otros lunares. Este comportamiento se continuó presentado por varios meses aumentando las sospechas de la dueña, hasta que llegó al punto en que la perra trató de morder la mancha. Esto provocó que buscara atención médica. La lesión fue retirada y revisada histológicamente confirmando melanoma maligno. Ahí fue la primera vez que se enunció la premisa de que los perros podían percibir debido a su desarrollado rinencéfalo tumores malignos como el melanoma.

Pasaron poco más de 10 años sin noticias aparentes sobre la posible habilidad de los perros para detectar el cáncer a través del olfato, hasta que en el 2001 se dio el segundo reporte de un perro que alerta a su dueño con una lesión en la piel. El reporte fue hecho por Church & Williams (2001), ellos reportaron sobre un hombre de 66 años de edad con un eczema en su muslo izquierdo el cual creció lentamente entre 1-2cm por 18 años. Pero cuando un labrador de nombre Parker llegó a su hogar en 1994, cerca de 5 años después el perro comenzó persistentemente a empujar su nariz contra la pierna del pantalón de su dueño, olfateando la lesión que estaba debajo de él. Esta actitud al igual que en el caso reportado en 1989 alertó al dueño a buscar ayuda médica. La lesión fue retirada quirúrgicamente y analizada histopatológicamente llegando al resultado que se trataba de carcinoma de células basales; después de la escisión de la lesión Parker no volvió a mostrar interés en el área. El hecho de que los perros en estos reportes hayan contribuido a prevenir la morbilidad y posiblemente la mortalidad de sus dueños llamó la atención de los medios.

2.9.1 Primeros estudios en biodetección de cáncer por perros

Tras los reportes hechos sobre la supuesta habilidad de los perros para reconocer cáncer de piel a través del olfato, en Estados Unidos se comenzó la primera investigación seria para evaluar esta habilidad. A la par de los Estados Unidos, en Inglaterra se realizaba una investigación similar pero enfocada en identificar cáncer de vejiga usando muestras de orina.

El primer estudio fue realizado por Pickel et al., (2004), en el cual se trató de demostrar si 2 perros podían localizar de forma confiable muestras de tejido de melanoma escondidas en la piel de personas sanas. Se entrenaron a 2 perros de trabajo con experiencia en detección de explosivos. Los resultados de esta investigación demostraron que los perros pueden ser entrenados para localizar el set de compuestos volátiles orgánicos desconocidos liberados por muestras de tejidos de melanoma. El perro A localizó el melanoma en 6 de los 7 pacientes, en contraparte el perro B solo hizo la búsqueda en 4 de estos pacientes, fallando una sola vez con el mismo paciente que el perro A. Se puede aseverar que el olor producido por el melanoma es reconocido como diferente de piel sana por los perros entrenados.

En el mismo año, en Inglaterra se publicó el estudio de Willis et al., (2004), el objetivo de su estudio era determinar si los perros pueden ser entrenados para identificar cáncer de vejiga en personas basados en el olor de la orina. Para esto se entrenaron 6 perros para discriminar orina de pacientes con cáncer de vejiga de aquella de pacientes sanos, utilizaron un condicionamiento con el método del clicker, en cada entrenamiento utilizaban una muestra de orina diferente. Al final después de 7 meses de entrenamiento se realizó una prueba para evaluar la efectividad del entrenamiento para identificar el olor del cáncer. Tomados como un solo grupo, los perros correctamente seleccionaron la orina positiva a cáncer de vejiga en 22 de 54 ocasiones, dando un promedio de porcentaje de éxito de 41%.

Después de estos estudios pioneros, las investigaciones continuaron, enfocándose en diferentes tipos de cáncer y diferentes tipos de muestras.

2.9.2 Estudios previos en biodetección de cáncer de piel

Aunado a los 2 primeros reportes de detección de cáncer de piel de Williams & Pembroke (1989) y Church & Williams (2001), 9 años después del primer estudio por Pickel et al., (2004), un nuevo reporte de caso fue publicado por Campbell et al., (2013), de un hombre de 75 años de edad quien acudió al doctor después de que su perro lamiera persistentemente una lesión asintomática detrás de su oreja. La posterior examinación reveló una lesión nodular en el surco postauricular la cual fue confirmada como melanoma maligna tras el estudio histológico.

Hasta el momento en que fue realizada esta tesis no se encontraron estudios adicionales en la detección de cáncer de piel utilizando el olfato canino.

2.9.3 Estudios previos en biodetección de cáncer urológicos

Gordon et al., (2008) determinaron si los perros pueden ser entrenados para identificar pacientes con cáncer oliendo la orina obtenida de un paciente con cáncer de próstata entre muestras control de voluntarios sanos. Para cada cohorte, se midieron la especificidad y la sensibilidad. Para la prueba de cáncer de próstata, se utilizaron 4 perros. 2 tuvieron un rendimiento significativamente mejor que el azar en especificidad y ninguno en sensibilidad.

Cornu et al., (2011) evaluaron la eficacia en la detección de cáncer de próstata por perros entrenados con muestras de orina humana. Después de una fase de entrenamiento que duró 16 meses, durante la cual el entrenador trabajó con un pastor belga Malinois 5 días/semana, el perro pasó a la fase de prueba experimental a doble ciego. Los resultados reportados de sensibilidad y especificidad fueron ambos por encima de 91%.

Broom et al., (2014) determinaron si los perros podrían ser entrenados para discriminar el olor de la orina de hombres con cáncer de próstata de muestras control. 3 perros alcanzaron la segunda fase de entrenamiento y 2 de estos aprendieron a discriminar potencialmente muestras de cáncer de próstata conocidas entre muestras control y pasar a la prueba experimental. Sin embargo, durante las pruebas a doble ciego usando muestras nuevas los perros no indicaron muestras de cáncer de próstata más frecuentemente que lo esperado solo por casualidad (Perro A sensibilidad 0.13, especificidad 0.71, Perro B sensibilidad 0.25, especificidad 0.75).

Taverna et al., (2015) en su trabajo 2 perros pastores alemán con experiencia en la detección de explosivos fueron entrenados para identificar los VOCs en muestras de orina de pacientes con cáncer de próstata. Para el perro 1 sensibilidad fue de 100% y la especificidad fue del 98.7%. Para el perro 2 la sensibilidad fue del 98.6 % y la especificidad fue del 97.6%. Cuando se consideró solo a hombres mayores de 45 años en el grupo control, el perro 1 logro un 100% de sensibilidad y 98% de especificidad y el perro 2 logró 98.6% de sensibilidad y 96.4% de especificidad.

Estos 4 estudios muestran una marcada disparidad, mientras que los estudios de Cornu et al., (2011) y Taverna et al., (2015) tienen una sensibilidad y especificidad ≥ 90 , los estudios de Broom et al.,(2014) y Gordon et al.,(2008) sus resultados tienen una sensibilidad $\leq 25\%$ y una especificidad $\leq 75\%$, una de las diferencias en el estudio de Broom et al., (2014) es el uso de un grupo control con neoplasias benignas en la fase experimental, mientras que en el de Gordon et al., (2008) la fase de entrenamiento fue impartida por los propietarios de los perros supervisados por profesionales.

Willis et al., (2004) diseñaron un experimento para determinar si los perros podían reconocer el olor de la orina o una combinación de olores, distintivos del cáncer de vejiga, y diferenciarlo de aquellos asociados a efectos secundarios a neoplasia como sangrado, inflamación, infección y necrosis) las cuales también pueden estar presentes en situaciones distintas de afecciones urinarias. Los perros entrenados, proporcionaron pruebas de que tenían esta capacidad (tasa media de éxito del 41% para las pruebas de orina seca y líquida combinadas, en comparación con el 14% esperado por casualidad solamente). Además, el análisis de regresión logística sugirió que esta capacidad era independiente de otras características químicas de la orina, como la sangre, los leucocitos, las proteínas, las cetonas, la bilirrubina, los nitritos y el urobilinógeno, que no eran factores de confusión significativos.

7 años más tarde este mismo equipo demostró que los compuestos orgánicos volátiles específicos del cáncer de vejiga están presentes en el espacio de cabeza de la orina, así como también demostraron que el 70% de los tumores podían ser correctamente identificados utilizando una nariz electrónica (Weber et al., 2011).

El estudio de Willis et al., (2010) buscó evaluar la sensibilidad y especificidad de un grupo de 4 perros entrenados. En una serie de 30 pruebas a doble ciego, cada una consistió de una muestra de orina de cáncer de vejiga colocada junto a 6 muestras control, la sensibilidad más alta lograda por un perro fue de 73%, y de forma general identificaron las muestras de cáncer correctamente 64% de las veces.

Para darle un nuevo enfoque en relación tipo de cáncer de acuerdo a la especie que afecta Dorman et al., (2017) realizaron un estudio cuyo propósito fue determinar si los perros podrían usar señales olfatorias para discriminar muestras de orina colectadas de perros que tuvieron carcinoma de células de transición del tracto urinario (TCC). La fase final del estudio el perro no indicó muestras de cáncer canino de TCC-positivo con más frecuencia de la esperada por casualidad. Este estudio ilustra la necesidad de considerar la memoria olfativa canina y el uso de métodos de doble ciego para evitar conclusiones erróneas con respecto a la capacidad de los perros para alertar sobre muestras de pacientes con cáncer canino.

2.9.4 Estudios previos en biodetección de cáncer colorrectal.

El estudio pionero para la detección de cáncer colorrectal por parte de perros entrenados es el hecho por Sonoda et al., (2011) un perro rigurosamente entrenado del centro de entrenamiento canino en Chiba, Japón participó en el estudio. Aliento exhalado y muestras de heces acuosas fueron obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) y de pacientes sanos a quienes se le comprobó previamente con una colonoscopia. La sensibilidad de la detección de las muestras de aliento fue de 0,91 y la especificidad de 0,99. La sensibilidad usando muestras de heces fue de 0,97 y la especificidad fue de 0,99. Además, la precisión de la detección de olor era alta incluso para el cáncer temprano, y esto podría sugerir que la enfermedad específica produce VOCs al principio de la patogénesis del CRC.

2.9.5 Estudios previos en biodetección de cáncer de mama.

McCulloch et al., (2006) entrenaron 5 perros para determinar si podían discriminar entre muestras de pacientes con cáncer de mama y pulmón entre controles sanos. Tanto para la fase de entrenamiento y prueba, 5 muestras fueron colocadas en estaciones especiales en el suelo, albergando una muestra de aliento de paciente con cáncer y 4 con muestras

control. Cada perro tuvo la oportunidad de olfatear cada muestra de aliento de paciente con cáncer y control. La Sensibilidad fue del 88% y la especificidad de 98 % en los diferentes estados de la enfermedad, no existió diferencia significativa entre los 5 perros.

Thuleau et al., (2018) desarrollaron en su estudio un método de detección de cáncer de mama transcutáneo utilizando el olfato canino. Las muestras utilizadas en el entrenamiento fueron compresas que estuvieron en contacto con la piel del seno afectado la noche entera previa a la cirugía. En la mañana, la compresa (muestra de secreción de la piel) fue removida por el participante. Para los pacientes con cáncer de mama, una segunda muestra fue colectada durante la cirugía. Después de la resección tumoral, una compresa fue puesta en contacto con el tumor por 1 minuto (muestra tumoral). Los perros fueron 2 pastores belgas entrenados en un periodo de 5 meses. 4 muestras tumorales fueron usadas ya que se supone que contienen mayor cantidad de VOCs sin alterar; después las secreciones de piel. Durante la prueba, los perros reconocieron el 90.3% de las muestras de secreciones de piel de cáncer de mama.

2.9.6 Estudios previos en biodetección de cáncer ovárico y cervical

Los resultados de Horvarth et al., (2008, 2010 y 2013) enuncian que el olor específico del carcinoma ovárico puede ser identificado por perros entrenados para el diagnóstico temprano y diferencial de otras enfermedades malignas. En su primer estudio en el 2008 se entrenó a un perro de la raza schnauzer gigante de 4 años de edad 2 veces a la semana por 12 meses para discriminar muestras de tumor que fueron almacenadas a -80°C al igual que las muestras control, la fase de prueba fue a doble ciego. Los resultados de esta prueba fueron de 100% de sensibilidad y 97.5 de especificidad. El perro fue capaz de distinguir entre tejido sano ovárico y carcinomas ováricos, lo que añade evidencia que un cambio de olor en un órgano-específico a carcinoma ocurre debido a cambios biológicos durante la carcinogénesis. En el segundo estudio en el 2010 se estableció si este olor específico de cáncer podría ser también encontrado en sangre. 2 perros (Lotti y Hanna) fueron entrenados en un periodo de 9 meses para detectar muestras de sangre de pacientes con cáncer ovárico. Para Lotti la sensibilidad fue del 100% y especificidad del 96% para ambos tejido y sangre. Para Hanna, la sensibilidad y especificidad fueron del 100% en las muestras de sangre. Este estudio da mayor sustento a su trabajo anterior y proponen que

los perros pueden ser capaces de identificar exitosamente carcinoma ovárico a través de una muestra de sangre. En su último estudio en el 2013 involucró a los mismos perros Hanna y Lotti para investigar si el olor del carcinoma ovárico en la sangre podría ser diferente después de un tratamiento de una cirugía primaria y quimioterapia, debido a la influencia del estado tumoral. En la serie 1 los resultados de las pruebas de Hanna tuvieron una sensibilidad de 97% y una especificidad de 100%, mientras los resultados de Lotti fueron una sensibilidad del 97% y una especificidad del 99%. La precisión de los perros fue baja comparada con la observada en los estudios anteriores Horvath et al. Los autores sugieren que esto es debido probablemente a que la cirugía combinada con la quimioterapia reduce en el número de células cancerígenas, por lo tanto, las moléculas de olor disminuyen en la sangre. Sin embargo, los perros aun mostraron una alta sensibilidad y especificidad. Para la serie 2, donde los perros olfatearon las muestras de sangre tomadas después de 3 meses del último tratamiento, la sensibilidad y especificidad de las pruebas de Hanna mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94%, por otro lado Lotti fue de 60% y 96% respectivamente. Los perros fueron capaces de identificar pequeñas cantidad de células cancerosas vivas con una alta precisión en un grupo grande de pacientes con cáncer, a pesar del muy bajo límite de detección, ellos fueron capaces de señalar recurrencias probables que no serían diagnosticadas por otro método.

Por último Guerrero Flores et al., (2017) entrenaron a un perro beagle para reconocer el olor del cáncer cervicouterino. Durante el entrenamiento, biopsias frescas de cáncer cervical fueron usadas como punto de referencia. Otras muestras usadas también incluyeron frotis en laminillas y gasas médico quirúrgicas usadas como toallas sanitarias por pacientes de cáncer cervical. La prueba se realizó a doble ciego cuando se evaluó la capacidad del perro para discriminar muestras de cáncer cervicouterino y muestras control. El beagle fue capaz de detectar los VOCs presentes tanto en las laminillas y las muestras del material absorbente. La tasa de éxito fue en general alta por encima del 90%.

2.9.7 Estudios previos en biodetección de cáncer pulmonar

El aliento exhalado ha sido analizado a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y ensayos de sensores de gases, los cuales producen un perfil característico que puede diferenciarse de los controles saludables.

McCulloch et al., (2006) reportaron que 5 perros ordinarios mantenidos en sus respectivos hogares fueron entrenados para distinguir a través del aroma de muestras de aliento exhalado. Las muestras de cáncer fueron clasificadas dentro de etapas 1-4 de adenocarcinoma y de 2-4 del tipo escamoso. Los 5 perros dieron en general una sensibilidad y especificidad de 99%, y sin diferencia estadística entre las diferentes etapas del cáncer. Este resultado es relevante ya que sugiere que los perros podrían discriminar etapas tempranas y preclínicas del cáncer.

Ehmann et al (2012) publicaron un estudio donde 4 perros fueron entrenados para detectar cáncer de pulmón. Muestras de aliento exhalado de 220 voluntarios (personas saludables, con cáncer y con enfermedad respiratoria crónica inflamatoria (EPOC)) fueron presentadas a los perros siguiendo un rígido protocolo científico. Los participantes fueron clasificados en 3 grupos: grupo A (n=110), el grupo saludable; grupo B (n=60), cáncer de pulmón; grupo C (n=50) EPOC. El cáncer de pulmón fue identificado en general con una sensibilidad del 71% y una especificidad del 93%.

En el estudio de Walczak et al., (2012) entrenaron 6 perros. Las muestras fueron colectadas, antes de cualquier tratamiento de quimioterapia. Los resultados en la detección en general fue de sensibilidad de 79% y la especificidad 78%, la probabilidad de responder correctamente al azar fue de 50%. La sensibilidad disminuyó aproximadamente al 50% cuando la probabilidad de una respuesta correcta al azar fue de 20%. Además, cuando un nuevo set de muestras fue presentado por primera vez la sensibilidad cayó aún más, aunque fue aun significativamente mejor que al azar.

Otro estudio fue el hecho por Amundsen et al., (2014) quienes hipotetizaron que las pruebas de olfato canino podrían ser útiles para la detección de cáncer pulmonar en pacientes sospechosos. Se tomaron muestras de aliento y orina antes que los pacientes se sometieran a una broncoscopia. Los diagnósticos confirmados fueron clasificados en: (1) sin cáncer; (2) cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC); (3) cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC); y (4) cáncer no pulmonar (carcinoide pulmonar, mesotelioma, o metástasis pulmonar de otra neoplasia primaria). Después de un entrenamiento intensivo, se realizaron pruebas con otras muestras aliento. La sensibilidad para la detección de SCLC fue del 100% y la especificidad del 33.3%, mientras que para

el grupo de NSCLC a 60% y la especificidad del 33.3%. Para la prueba de con muestras de orina la sensibilidad y especificidad para SCLC fueron 80% y 29.2% respectivamente y la sensibilidad y especificidad para NSCLS fue del 60% y 29.2% respectivamente.

Existe un estudio donde se utiliza a perros entrenados como método de detección de cáncer de pulmón en un situación parecida a la real es decir sin muestra positiva a cáncer en algunas pruebas (Hackner et al., 2016). Las muestras de aliento de personas fumadoras y no fumadoras fueron presentadas para entrenar a un grupo de 6 perros. Los valores predictivos finales positivos y negativos de 30.9% y 84.0%, respectivamente, fueron bastante bajo en comparación con otros estudios. Una de las posibles causas del pobre desempeño puede deberse al alto nivel de estrés por la falta de una muestra positiva en las rondas para los perros y los manejadores.

2.9.8 Estudios previos en biodetección de cáncer a través del cultivo celular

El primer estudio que se realizó sobre la capacidad que tendrían los perros para discriminar líneas celulares de cáncer fue el realizado por Yoel et al., (2015), en este estudio evaluaron la habilidad de perros entrenados para detectar la línea celular de cáncer de mama (MCF7) entre muestra control de línea celular de queratinocitos pseudo-normal (HaCat), así como también para detectar cultivo celular malignos de melanoma (BG) y carcinoma pulmonar epitelial -2 (A549) para los cuales no había tenido contacto previo durante el entrenamiento. Los 2 perros entrenados seleccionaron todas las muestras objetivo de MCF7 con la que ellos habían sido entrenados (10/10) así como las muestras objetivo a las que nunca habían sido expuestos A549 (5/5) y BG (5/5), e ignoraron todas las muestras control. Por lo tanto la sensibilidad y especificidad para ambos perros fue del 100%. Estos resultados apoyan la premisa que las células cancerígenas tiene un patrón de olor único y que este patrón es común en diferentes tipos de cáncer.

El siguiente experimento de Schallschmidt et al., (2015) no consiguió obtener resultados parecidos a los de Yoel et al., (2015) sino lo contrario. El objetivo del estudio fue usar las líneas celulares como modelo de generación de marcadores volátiles de cáncer y entrenar a los perros para poder identificarlos. Se hicieron tomas de muestras de gas con una jeringa de 100 ml con una aguja del calibre 19 que se acoplaba a la tapa del frasco del cultivo celular sin células usadas como control y del cultivo de líneas celulares de

adenocarcinoma pulmonar humano A549 y Lu7466 como muestra objetivo. Durante la prueba a doble ciego, el perro 1 indicó solo 2 veces la muestra positiva correctamente, mientras que las muestras negativas fueron indicadas en 8 ocasiones. 4/10 muestras negativas nunca fueron indicadas por el perro 1. El perro 2 indicó una muestra positiva correctamente, mientras que las muestras negativas fueron indicadas en 9 ocasiones. 5/10 muestras negativas nunca fueron indicadas por el perro 2.

Seo et al., (2018) realizaron un estudio para saber si los perros entrenados para identificar a través del olfato un solo tipo de cáncer eran capaces de identificar cánceres desconocidos para ellos. Se utilizaron líneas celulares murinas de cáncer de mama (4T1) y colorrectal (CT26). Las muestras consistían en líquido del medio de cultivo donde las células cancerosas habían sido cultivadas para el caso de las muestras objetivo; las muestras control fueron el líquido del medio de cultivo primario de tejido mamario y colorrectal de ratones hembras libres de cáncer. El perro 1 entrenado para identificar 4T1 obtuvo un 94% de sensibilidad (75/80) mientras que el perro 2 entrenado para localizar CT26 su sensibilidad fue también de 94% (75/80). Los resultados para la prueba para los cánceres desconocidos para los perros; en donde el perro 1 intercambiaba muestra objetivo con el perro 2, fueron una sensibilidad de 91% (73/80) para el perro 1 con CT26 y 95% (76/80) para el perro 2 con 4T1. A través de estos resultados se verificó que el olfato canino puede discriminar el olor de los desechos metabólicos de células cancerosas de aquellos de células benignas, y que no existe diferencia significativa entre el olor específico de los desechos del cáncer de mama y aquellos de cáncer colorrectal.

El más reciente estudio del que se tiene conocimiento al momento de esta tesis es el realizado por Murarka et al., (2019); el objetivo fue entrenar 3 perros para identificar una línea celular de cáncer ovárico (OVKATE) entre muestras de medio de cultivo y cultivo celular de trompas de Falopio. Solo un perro fue capaz de discriminar OVKATE entre el medio de cultivo. Cuando el perro que había sido entrenado con la línea celular OVKATE probó si era capaz de reconocer el olor pero esta vez en una matriz distinta (plasma de sangre de paciente confirmada con cáncer ovárico) a través de 3 rondas, el perro titubeó en la muestra objetivo, sugiriendo que un entrenamiento canino con líneas celulares podrían servir como medio de preparación para la identificación de plasma de sangre de

personas con cáncer ovárico, pero no un cambio radical. A pesar del resultado, el comportamiento de los perros les da una pista que este método podría servir en un futuro para la producción de herramientas para la detección temprana de cáncer ovárico.

3. JUSTIFICACIÓN

El melanoma es una patología agresiva y potencialmente fatal que se ha incrementado en los últimos años en la población. Por lo tanto, es necesario la creación de nuevos métodos diagnósticos que ayuden a identificarlo en etapas tempranas y disminuyan las altas tasas de mortalidad. La utilización de un perro entrenado como biodetector de cáncer es un método que ofrece ventajas como una alta sensibilidad y especificidad, no es invasivo y no requiere equipo sofisticado para su implementación.

Un entrenamiento canino utilizando líneas celulares como muestra objetivo es una alternativa que presenta ventajas en comparación con el uso de muestras de fluidos biológicos y tejidos de pacientes con cáncer. Por lo que es necesario evaluar y obtener información sobre la capacidad que tiene el olfato canino para identificar melanoma en un modelo murino cuyo entrenamiento previo haya sido solo con líneas celulares.

4. HIPÓTESIS

Un protocolo de entrenamiento de biodetección canina utilizando la línea B16F10 permite la identificación de melanoma en un modelo murino.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar un protocolo de entrenamiento canino utilizando la línea celular B16F10 para la detección de melanoma en un modelo murino.

.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1.- Evaluar en un modelo *in vitro* un protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 basado en el método de entrenamiento utilizado para perros de detección operativos.
- 2.- Determinar la capacidad del perro entrenado para la detección de melanoma en un modelo murino
- 3.- Determinar la capacidad del perro entrenado para la detección de melanoma murino a través de muestras biológicas de orina y heces.
- 4.- Establecer, en base a los resultados obtenidos, un protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 para la detección de melanoma in vivo.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Cultivo de la línea celular B16F10

El cultivo de las células de melanoma utilizadas como muestras objetivo se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La línea celular B16F10 (*mus musculus* células de piel de melanoma) fue cultivada en frascos de cultivo celular de 25 cm² con 4 ml de medio de cultivo celular DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium Santa Cruz®) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Cellgro Corning®) y 1% penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Invitrogen, Gran Island, NY) a 4% CO², 95% de humedad y 37°C de temperatura.

Las muestras control utilizadas para el entrenamiento *in vitro* consistían de 4 ml de medio de cultivo DMEM colocadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro.

6.2 Modelo *in vivo*

Se emplearon 9 ratones adultos de la cepa C57BL/6 con un peso promedio de 25 gr. para el modelo *in vivo* y parte del entrenamiento. La Facultad de Ciencias Biológicas proporcionó los ratones. Los ratones fueron alojados en un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad alimentados con alimento para roedores y agua *ad libitum*.

6.3 Muestras biológicas de heces y orina

Para la recolección de heces se colocaron a los ratones sanos en una jaula limpia y desinfectada, se esperaba a que los ratones defecaran para recoger las heces con ayuda de una pinza de disección y estas se colocaban en criotubos de 5 ml para ser almacenados en refrigeración a -20 °C hasta el día en que fueron utilizadas.

En la recolección de orina los ratones sanos eran colocados en una jaula limpia y desinfectada. Cuando los ratones orinaban dentro de la jaula se tomaba una torunda de algodón y se absorbía la orina. La torunda se tomaba con una pinza de disección y se guardaba en un criotubo de 5 ml, posteriormente se almacenaba en refrigeración a -20 °C.

La recolección y almacenamiento de las muestras de heces y orina de ratones inoculados con células de melanoma se realizó de la misma manera que los ratones sanos, un día antes de la prueba con muestras biológicas.

6.4 Perros

Se incluyeron 3 perros sujetos principalmente a disponibilidad dentro del experimento, 2 hembras (“Coyota” pastor belga Malinois de 2 años de edad y “Jazz” pastor alemán de 4 años de edad) y un macho (Cheeto pastor ganadero australiano de 1 año de edad) **Figura 3**. Todos los perros recibieron entrenamiento previo en la detección de cadáveres y explosivos. Estos perros no fueron seleccionados ni entrenados desde cachorros para la detección de cáncer, sin embargo, cumplían con el perfil de un perro de detección como los describe Jamieson et al., (2017) para incluirlos en el experimento.

Los perros estaban hospedados en el centro de entrenamiento canino “La Huella” en el municipio Dr. González en el estado de Nuevo León que cuenta con un clima semiseco con una temperatura promedio de 24 °C, y alimentados 2 veces al día con una dieta a base de carne cruda y croquetas. No hubo limitaciones en el tema de resguardo, no obstante cuando eran resguardados se alojaban en jaulas de 3x3 m. techadas.



Figura 3. Perros A) Coyota, B) Jazz, C) Cheeto

6.5 Entrenamiento

El entrenamiento tomo lugar en un cuarto de piso firme y techado, por 2 entrenadores del grupo manada k-9 expertos en el entrenamiento de perros de detección. Los perros

entrenaban 2 veces al día con una duración de 10-15 minutos cada una por 55 días distribuidos en el periodo de agosto de 2019 – febrero de 2020.

El entrenamiento se componía de 3 fases (Inducción, Fijación y Discriminación). La técnica utilizada durante todo el entrenamiento fue el moldeo libre y captura de comportamiento.

6.5.1 Fase de inducción

La fase de inducción tuvo una duración de 7 días, en esta fase el perro entró en contacto con el aroma que debía memorizar (células de melanoma en la caja de cultivo).

Se preparaba el material para el entrenamiento sobre una mesa, se colocaba una base de fierro en la que se acoplaban insertos de cocina de acero inoxidable, dentro del recipiente se acomodaron 2 cajas de cultivo celular, el manejo de las cajas se realizaba con guantes de vinilo sin talco, se retiró la tapa de las cajas de cultivo y sobre ellas se sobrepone otro recipiente de acero inoxidable perforado con los agujeros orientados hacia donde está la boca de las cajas de cultivo para permitir el paso del aroma de las cajas a través de los orificios (**Figura 4**).

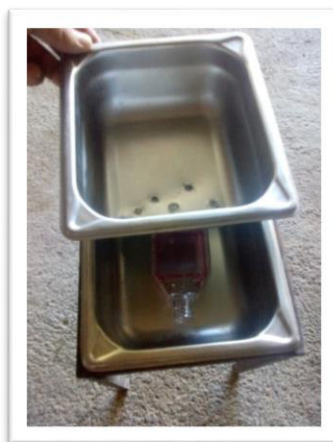


Figura 4. Recipiente con muestra objetivo.

La base con los recipientes y cajas de cultivo ya montadas se colocaban en el suelo, se traía al perro a lugar de trabajo y se esperaba a que acercara su nariz a la muestra y olfateara por sí mismo sin darle indicaciones (cuando el perro no mostraba interés, se señalaba con la mano al recipiente), cuando el perro acercaba su nariz al recipiente se hacía clic y se premiaba con croquetas en el recipiente cerca de los orificios para que al ser comidas el perro se mantuviera olfateando la muestra, se repetía esta acción hasta terminar con su ración de comida, se distribuía la cantidad de croquetas para que la sesión durara 10-15 minutos (**Figura 5**).

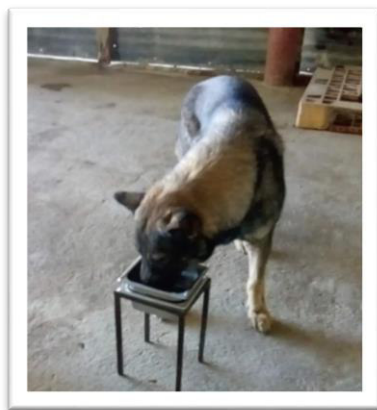


Figura 5. Jazz oliendo la muestra objetivo en la fase de inducción.

Terminada cada sesión de entrenamiento los recipientes eran lavados con agua y jabón, después rociados con alcohol al 70%.

6.5.2 Fase de fijación

El propósito de esta etapa fue que el perro señalara la muestra objetivo (caja de cultivo con células de melanoma) y se quedara fijado en el recipiente el tiempo que deseáramos.

Se utilizaron 3 recipientes armados de la misma forma que en la fase de inducción es decir la base de fierro, encima el recipiente, y acomodado arriba del mismo el recipiente perforado, 2 de ellos estaban vacíos y 1 contenía la muestra objetivo, para esta fase se redujo la cantidad de muestra a solo una caja de cultivo celular.

En el primer día de fijación los 3 recipientes estaban alineados y separados a $\frac{1}{2}$ metro de distancia y a 3 metros del entrenador, se traía al perro al área de entrenamiento y se le daba la orden de sentado, ya que se tiene la atención del perro se daba la orden de “busca” y se señalaba con el brazo extendido los recipientes, cuando el perro se acercaba a olfatear

el recipiente con la muestra objetivo se hacía clic y se premiaba con croquetas dentro del recipiente.

Una vez que el perro terminaba de comer las croquetas se le llamaba de vuelta, se cambiaba de lugar los recipientes sujetándolos desde la base así como su alineación, esta se cambiaba a diagonal, rectangular, circular, en cruz etc.; y se repetía de nuevo el ejercicio hasta terminar su ración de comida. A mitad de la sesión se cambiaba el recipiente perforado de la muestra objetivo por 1 limpio, para evitar que el perro se guiara a través del olfato de los restos de comida o saliva dejados en el recipiente.

En los días posteriores se realizaba de la misma manera que en el primer día pero subiendo la dificultad al aumentar el número de recipientes del día 2-5 (3 recipientes vacíos) día 5-10 (5 recipientes vacíos) día 10-14 (9 recipientes vacíos), cambiando los recipientes perforados por tapas con un orificio de 3 cm de diámetro en uno de los bordes (**Figura 6**); la boca de la caja de cultivo celular se orientaba hacia el orificio de la tapa. Se daba la orden de sentado al perro y después el comando de “busca”.

El perro olía cada recipiente a través del orificio de la tapa, cuando olfateaba cerca del recipiente con la muestra objetivo se presionaba el clicker y el perro regresaba con el entrenador por su premio, él entregaba las croquetas directamente en el hocico del perro sin dejar caer alguna o la mayoría.



Figura 6. Recipientes con tapa

A partir del día 2 se reforzó más el tiempo de fijación, es decir el tiempo que el perro pasaba olfateando la muestra, demorando el tiempo de entrega del premio paulatinamente hasta 10 segundos y se comenzó a dar la orden de la señal de marcaje, la señal de marcaje para Coyota y Jazz era el quedarse quieta frente a la muestra objetivo mientras que Cheeto era sentarse frente a la muestra; conforme pasaban las sesiones se dejaba de dar el comando y el perro lo hacía por asociación, cada que identificaba el aroma de la muestra se sentaba por si solo o quedaba quieto frente a la muestra y fijado.

En los 2 últimos días de la etapa de fijación a la mitad de la sesión se realizaron ejercicios de especificidad, se retiró la muestra objetivo, se dio la orden de búsqueda al perro, después de que el perro olfateó todos los recipientes y no marcó ninguno se hizo clic y se premió.

Después de 14 días de entrenamiento los perros no fallaban en identificar la muestra objetivo entre los recipientes vacíos, y su marcaje era de forma correcta.

6.5.3 Fase de discriminación

En esta etapa el objetivo es que el perro pudiera discriminar las células de melanoma entre las muestras control de medio DMEM sin células así como ratones sanos

En el primer día se montaron 6 recipientes con sus respectivas bases y tapas, un recipiente contenía la muestra objetivo (una caja de cultivo con células) 1 recipiente más contenía una caja de cultivo celular vacía, y los restantes recipientes se encontraban vacíos.

Se daba el comando de búsqueda y el perro olfateaba cada uno de los recipientes, cuando identificaba correctamente la muestra objetivo se hacía clic y se premiaba al perro, después se cambiaba la posición de los recipientes para reiniciar el ejercicio y así sucesivamente hasta terminar la sesión. Este mismo procedimiento se realizó por 1 día más.

En el tercer día, además de la muestra objetivo y la caja de cultivo celular vacía, se añadieron 4 ml de medio de cultivo celular depositados en 2 cajas Petri de plástico (100x15 mm) (**Figura 7**), el ejercicio se realizó de la misma manera que en el primer día realizando 25 rondas por cada sesión de entrenamiento.



Figura 7. Muestra control medio DMEM en caja Petri

Cuando los perros lograban discernir la muestra objetivo entre la muestra control y la caja de cultivo celular vacía se agregaron al entrenamiento 2 ratones de la cepa C57/BL6 colocados dentro de un recipiente diferente para cada ratón y se cubrían con la tapa, se empleó cinta adhesiva con respaldo de papel en los costados de los recipientes para prevenir que los ratones escaparan, en el orificio de la tapa se cubrió con cinta adhesiva y se hicieron perforaciones para permitir el paso del aroma del ratón. Se colocó cinta también en los demás recipientes para que presentaran las mismas condiciones, el de la muestra objetivo, las 2 del medio DMEM, y un contenedor vacío. El ejercicio era el mismo, identificar la muestra objetivo por parte del perro e ignorar los distractores y premiar cuando lo realizara de forma correcta hasta completar las 25 rondas por sesión.

Una vez que los perros cometían el mínimo de errores en la discriminación de la muestra objetivo es decir una tasa de éxito en 24/25 de las rondas realizadas (sensibilidad del 96%) se procedía a realizar la prueba experimental.

6.6 Prueba de detección de melanoma en un modelo *in vitro*

La prueba se realizó en el área donde entrenaban los perros, se colocaron 6 recipientes montados sobre las bases de hierro (1 contenía la muestra objetivo, 4 las muestras control de medio DMEM, una caja de cultivo vacía estéril, un recipiente vacío) por cada prueba realizada, 25 rondas en cada prueba en 3 días diferentes (**Figura 8**). Después de cada ronda realizada el recipiente que contenía la muestra objetivo se cambiaba de posición

aleatoriamente lanzando un dado, fue una prueba a un solo ciego, el manejador y perro no conocían la posición de la muestra objetivo antes de cada ronda.



Figura 8. Coyota señalando muestra objetivo en la prueba *in vitro*.

6.7 Entrenamiento para la prueba del modelo murino

El entrenamiento se realizó al aire libre en una superficie de pasto y tierra por las mañanas por 5 días con duración de 12 – 15 minutos por sesión.

Se utilizó una caja de cultivo con células pero sin medio DMEM como muestra objetivo, el medio de cultivo se retiró en el laboratorio. Se colocó la muestra objetivo en un recipiente con tapa y junto a este 3 recipientes vacíos además el primer día se agregó un ratón sano en su jaula sin limpiar estando visible para el perro, el objetivo era identificar la caja de cultivo celular e ignorar al ratón en la jaula.

En el segundo día y hasta que terminó entrenamiento se colocó la muestra objetivo, 2 recipientes vacíos, el ratón sano dentro de un recipiente y un pedazo de madera o plástico de 4 cm de altura que servía como sostén para el recipiente perforado que se colocaba encima y evitaba que presionara al ratón dentro, se aseguraba con cinta adhesiva el recipiente al igual que el resto. Al recipiente perforado se le aumentaron el número de orificios de 6 a 12 para permitir un mayor paso de aroma, se cambiaron las tapas de los demás recipientes por recipientes perforados. En cada día que restaba de entrenamiento se cambiaba de ratón. En el quinto día el perro no fallaba en identificar la muestra objetivo mientras ignoraba al ratón por lo que se procedió a realizar la prueba en un modelo murino.

6.8 Prueba de detección de melanoma en un modelo murino

Para esta prueba fue necesario inocular 4 ratones de la cepa C57/BL6 (2 machos y 2 hembras) con 750,000 células de melanoma B16F10 en 200 μ L de medio DMEM. La inoculación fue en la cara interna del miembro posterior o en la región dorsal vía subcutánea.

Para la primera prueba *in vivo* se incluyó un ratón macho de 15 días post inoculación con una masa tumoral de 1.4 cm de diámetro. Mientras que en la segunda prueba fue una hembra de 21 días post inoculación con una masa tumoral de 1.6 cm de diámetro.

Previo a la prueba, se realizan unas rondas de preparación a manera de “recordatorio” del aroma. Únicamente se colocaron una muestra objetivo de células de melanoma y 3 recipientes vacíos. Después de la preparación prosiguió la prueba *in vivo*, esta se realizó a un solo ciego. Cada prueba constaba de 10 rondas, en cada ronda el objetivo del perro era olfatear cada uno de los recipientes y señalar la muestra objetivo (ratón con cáncer o muestra biológica de ratón con cáncer) mientras ignora a los demás de la misma manera en que lo realizó en la etapa *in vitro*. Después de cada ronda la muestra objetivo era cambiada de posición. El criterio de evaluación para cada ronda era, “acierto” el perro identificaba y señalaba la muestra correctamente (verdadero positivo), “error” cuando el perro señalaba la muestra control o recipiente vacío (falso positivo), “titubeo” cuando el perro olía todos los recipientes y no hacía ningún marcaje o lo hacía con falta de determinación.

6.8.1 Configuración experimental de la 1ra prueba *in vivo*

En la primera prueba 4 recipientes (3 vacíos y 1 ratón con un tumor de 1.4 cm de diámetro) se alinearon aleatoriamente.

6.8.2 Configuración experimental 2da Prueba *in vivo*

Se colocaron 3 insertos (1 vacío, 1 ratón sano y 1 ratón con un tumor de 2 cm de diámetro) aleatoriamente.

6.8.3 Configuración experimental prueba con muestras biológicas de heces y orina

Se colocan 3 recipientes alineados (1 vacío, 1 muestras de heces u orina de ratón sano y 1 muestra de ratón con melanoma).

6.9 Análisis de datos

Para obtener los resultados de sensibilidad y especificidad de los datos obtenidos se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{número de verdaderos positivos}}{\text{Numero de verdaderos positivos} + \text{número de falsos negativo}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{número de verdaderos negativos}}{\text{Numero de verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}}$$

Distribución binomial

Para determinar si un perro identificó las muestras basado en el entrenamiento y no meramente al azar utilizamos la fórmula de distribución binomial y de Bernoulli con base en el trabajo hecho por Pickel et al., (2004) con modificaciones acorde a nuestro experimento.

El número de opciones posibles fue consideraba igual al número de recipientes presentes. Las respuestas fueron clasificadas como correcta (muestra objetivo localizada) o incorrecta (el perro señala muestra control, recipientes vacíos o no hace indicación alguna). La probabilidad de que el perro seleccionara el melanoma al azar fue tomada como $1/X$ donde la X es definida como el número de recipientes presentes incluyendo el que contiene la muestra objetivo en el ensayo. De manera similar la probabilidad de que el perro señalara una muestra de forma incorrecta fue tomada como $(X-1)/X$: el número de recipientes sin incluir el que contiene la muestra objetivo dividido entre el número total de recipientes.

Formula de distribución binomial

$$P_{(x)} = \binom{n}{x} p^x q^{n-x}$$

Donde:

n = número de ensayos/experimentos

x = número de éxitos

p = probabilidad de éxito

q = probabilidad de fracaso (1-p)

Formula de Bernoulli

$$f(x) = p^x (1-p)^{1-x}$$

Donde:

X = variable # de éxitos

p = Probabilidad de éxitos (x)

q = Probabilidad de fracaso (1-p)

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del protocolo de entrenamiento y fases de evaluación.

De los 3 perros que comenzaron el entrenamiento con la línea celular, solo Coyota y Cheeto fueron capaces de completar las 3 fases del entrenamiento y pasar a las fases de evaluación (**Tabla 1**). Jazz quedó descartada en la fase de fijación, ya que no daba señal de alerta correctamente y señalaba recipientes vacíos como muestra objetivo.

Tabla 1 Fases completadas

Perro	Entrenamiento línea celular	con Evaluación murino	modelo Evaluación muestras biológicas
Coyota	✓	✓	✓
Cheeto	✓	✓	✓
Jazz	X	X	X

7.1.2 Evaluación del entrenamiento en un modelo *in vitro*

Para el modelo *in vitro* los resultados se basaron en 3 pruebas con 25 rondas cada una, realizadas en 3 días distintos para Cheeto y Coyota, las cuales se realizaron a un ciego.

Cheeto marcó todas las muestras objetivo como positivo en las 75 rondas realizadas en donde estaban las cajas de cultivo celular con la línea B16F10 y no marco ninguna muestra con medio de cultivo sin células o caja de cultivo celular vacía. En todas las rondas no mostro alguna vacilación. Por lo tanto los valores de sensibilidad y la especificidad fueron del 100% para ambos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Identificación de melanoma *in vitro* (Cheeto)

PRUEBA	INDICACIÓN	CÁNCER	CONTROL	VACILACIÓN
	DEL PERRO			
1^{ERA}	Positivo	25	0	0
	Negativo	0	25	
2^{DA}	Positivo	25	0	0
	Negativo	0	25	
3^{ERA}	Positivo	25	0	0
	Negativo	0	25	
SUMA		75/75	75/75	0
SENSIBILIDAD		100%		
ESPECIFICIDAD			100%	

Coyota marcó la muestra objetivo en 73 de las 75 rondas realizadas, no señaló ninguna muestra de medio de cultivo sin células o caja de cultivo celular vacía como positiva y vaciló en 2 ocasiones. De esta manera la sensibilidad fue de 97.3% y una especificidad del 100% (**Tabla 3**).

Tabla 3. Identificación de melanoma *in vitro* (Coyota)

PRUEBA	INDICACIÓN DEL PERRO	CÁNCER	CONTROL	VACILACIÓN
1^{ERA}	Positivo	25	0	0
	Negativo	0	25	
2^{DA}	Positivo	24	0	1
	Negativo	0	25	
3^{ERA}	Positivo	24	0	1
	Negativo	0	25	
SUMA		73/75	75/75	2
SENSIBILIDAD		97.3%		
ESPECIFICIDAD			100%	

La probabilidad de señalar todas las muestras correctamente en cada prueba fue de $3.182 \cdot 10^{-20}$ cuando la probabilidad de éxito es de 16.6% mientras que las del fracaso es de 83.4%. La probabilidad de señalar la muestras objetivo al azar fue del 0.16 por lo que los resultados de las prueba fueron mejores que los realizados meramente al azar.

7.2 Evaluación en un modelo murino del protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 basado en el método de entrenamiento utilizado para perros de detección operativos

7.2.1 Primera prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Cheeto)

En la primera prueba, Cheeto no logro identificar al ratón con cáncer, orinando el recipiente donde se encontraba el ratón con cáncer, por lo que se impregnó orina de Cheeto en los demás recipientes para que los contenedores tuvieran el mismo olor y la única diferencia fuera la presencia del ratón enfermó así mismo se agregó un ratón sano como control. Los resultados después de la primera ronda se encuentran en la **Tabla 4**, en 6/10 rondas señaló al ratón sano y titubeo solo en una ocasión, la sensibilidad fue del 30% identificando al ratón con cáncer en las 3 últimas rondas realizadas.

Tabla 4. Identificación de melanoma en un modelo murino (Cheeto)

Ronda	Acierto	Error	Titubeo
1		X	
2		X	
3		X	
4			X
5		X	
6		X	
7		X	
8	X		
9	X		
10	X		

La probabilidad de señalar las muestras al azar fue de 0.2813, con una probabilidad de éxito en cada prueba del 0.25, los resultados obtenidos fueron ligeramente mejores que los realizados meramente al azar.

7.2.2 Segunda prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Cheeto)

En la segunda prueba realizada 22 días después de la primera, la sensibilidad en la detección de melanoma en un modelo murino fue de 100% (10/10). Cheeto no marcó en ninguna ocasión al ratón sano es decir mostró una especificidad del 100% como se muestra en la **Tabla 5** mostrando una evidente mejoría con respecto a la primera prueba.

Tabla 5. Identificación de melanoma en un modelo murino 2da prueba (Cheeto)

Ronda	Acierto	Error	Titubeo
1	X		
2	X		
3	X		
4	X		
5	X		
6	X		
7	X		
8	X		
9	X		
10	X		

La probabilidad de obtener un 100% de éxito en todas las pruebas era del 1.531×10^{-5} con un 0.33 de éxito en cada ronda. La probabilidad de identificarlas meramente al azar era del 0.2359.

7.2.3 Primera prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Coyota)

En la primera prueba que desempeñó Coyota en la detección de melanoma en un modelo murino los resultados fueron una sensibilidad del 42% (3/7), 2/7 rondas señaló al recipiente vacío como muestra objetivo y 2/7 titubeos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Detección de melanoma en un modelo murino (Coyota)

Ronda	Acierto	Error	Titubeo
1			X
2	X		
3	X		
4	X		
5			X
6		X	
7		X	

La probabilidad de seleccionar la muestra completamente al azar en la prueba fue de 0.3550 con una probabilidad de éxito en cada ronda de 0.25. Por lo que los resultados de la prueba son mejores a los realizados meramente al azar.

7.2.4 Segunda prueba de detección de melanoma en un modelo murino (Coyota)

En la segunda prueba de Coyota los resultados para los verdaderos positivos fue de 5/10, mientras que para los falsos positivos 5/10, sin titubear en ninguna de las rondas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Detección de melanoma en un modelo murino 2da prueba (Coyota)

Ronda	Acierto	Error	Titubeo
1	X		
2	X		
3		X	
4		X	
5	X		
6		X	
7		X	
8	X		
9	X		
10		X	

La probabilidad de éxito meramente al azar en toda la prueba fue de 0.2359 con una probabilidad de éxito por ronda de 0.33. La sensibilidad fue mejor que la realizada meramente al azar.

En la **Tabla 8** se muestra la comparativa de los porcentajes de sensibilidad y especificidad de las 2 pruebas para ambos perros. En la primera prueba Coyota mostro mejores resultados que Cheeto, mientras que este mostró mejores resultados en la segunda prueba. Ambos perros mostraron mejoría en los porcentajes de sensibilidad en la segunda prueba en comparación con la primera.

Tabla 8. Comparación de sensibilidad y especificidad de Cheeto y Coyota

Prueba1	CHEETO	COYOTA
Sensibilidad	30%	42.8%
Especificidad	40%	71.42
Prueba 2		
Sensibilidad	100%	50%
Especificidad	100%	50%

7.3 Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas de orina y heces

7.3.1 Primera prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Coyota)

En la primera prueba de detección de heces por parte de Coyota, no realizó ningún marcaje después de oler los 3 recipientes en rondas seguidas, por lo que se decidió terminar la prueba. En el caso de la primera prueba para la prueba de orina tuvo 3 errores en las rondas realizadas. Al percibir que Coyota no realizaba los marcajes de forma adecuada se dio por terminadas ambas pruebas. **Tabla 9**

Tabla 9. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas (Coyota)

HECES	RONDA 1	RONDA 2	RONDA 3
RESULTADO	Titubeo	Titubeo	Titubeo
ORINA			
RESULTADO	Falso Positivo	Falso Positivo	Falso Positivo

La probabilidad de identificar la muestra objetivo completamente al azar en todas las rondas de la prueba fue de 0.0359 con un 0.33 de probabilidad de éxito en cada ronda. En ambas pruebas de heces y orina la sensibilidad y especificidad fue igual a 0.

7.3.2 Segunda prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Coyota)

La segunda prueba de detección Coyota no logro identificar en ninguna ocasión la muestra de heces de ratón con cáncer, en 6 rondas marco la muestra control como positiva y titubeó en 4 ocasiones. Para las muestras con orina se identificaron como positivas 6/10, 3 falsos positivos y un solo titubeo **Tabla 10**.

Tabla 10. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas 2da prueba (Coyota)

SEGUNDA PRUEBA	VERDADEROS POSITIVOS	FALSOS POSITIVOS	TITUBEOS
HECES	0	6	4
ORINA	6	3	1

La probabilidad de seleccionar los recipientes con la muestra objetivo de forma aleatoria en la prueba fue de 0.2359 con un 0.33 de probabilidad de éxito en cada ronda. En la prueba con heces Coyota obtuvo una sensibilidad de 0 y una especificidad de 0 para el caso de la orina una sensibilidad de 0.6.

7.3.3 Primera prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Cheeto)

En la primera prueba de detección de heces para Cheeto no logró identificar la muestra de heces de ratón con cáncer, marcando como positivo 8 muestras control como positivas y titubeando en 2 ocasiones. En el caso de la Orina Cheeto señaló la orina de ratón con cáncer en 3 rondas, al ratón sano como positivo en 4 y por ultimo titubeo en 3 ocasiones **Tabla 11.**

Tabla 11. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas (Cheeto)

PRIMERA PRUEBA	VERDADEROS POSITIVOS	FALSOS POSITIVOS	TITUBEOS
HECES	0	8	2
ORINA	3	4	3

La probabilidad de seleccionar las muestras al azar fue de 0.2359 con una probabilidad de éxito en cada ronda de 0.33. Por lo que los resultados no son mejores que los realizados al azar.

7.3.4 Segunda prueba de detección de melanoma en muestras biológicas (Cheeto)

En la segunda prueba Cheeto identificó las heces de ratón con cáncer en 7/10 rondas, mientras que señaló la muestra control como positiva en 3/10 ocasiones. En la detección de orina en 6/10 se marcó como verdadero positivo la orina del ratón enfermo, en 3/10 se señaló al ratón sano y solo titubeo en una ocasión.

Tabla 12. Detección de melanoma murino a través de muestras biológicas 2da prueba (Cheeto)

SEGUNDA PRUEBA	VERDADEROS POSITIVOS	FALSOS POSITIVOS	TITUBEOS
HECES	7	3	0
ORINA	6	3	1

Los resultados de la segunda prueba son mejores que los realizados meramente al azar.

7.3.5 Comparación de sensibilidad de la primera prueba en la detección de melanoma en el modelo *in vitro*, modelo *in vivo* y muestras biológicas

En la **tabla 13** se observa resultados altos de sensibilidad en la identificación de melanoma en un modelo *in vitro*, mientras que para el modelo *in vitro* estos decaen. La sensibilidad para el modelo usando muestras biológicas no es mejor que las realizadas meramente al azar.

Tabla 13. Comparación de sensibilidad en la identificación de melanoma entre los diferentes modelos

SENSIBILIDAD	MODELO <i>IN VITRO</i>	MODELO <i>IN VIVO</i>	MUESTRA HECES	MUESTRA ORINA
CHEETO	100%	30%	0%	30%
COYOTA	100%	42%	0%	0%

7.4 Establecimiento del protocolo de entrenamiento canino con la línea celular B16F10 para la detección de melanoma *in vivo* basado en los resultados obtenidos.

En base a los resultados obtenidos se sugieren las siguientes pautas del protocolo de entrenamiento.

7.4.1 Perros

Perros sanos seleccionados, dedicados exclusivamente al entrenamiento para la identificación del aroma del cáncer, condición corporal 3, esquema de vacunas y desparasitaciones al corriente y completo, contar con asistencia veterinaria inmediata en caso de necesitarla, excluir perros braquiocefálicos debido a que su condición anatómica limita una eficiente olfacción.

7.4.2 Instrumentos

Utilizar el clicker por su sincronización al reforzar. Recipientes y tapas de acero inoxidable (los recipientes son insertos de cocina de 1/6 al igual que las tapas), bases de fierro en donde se puedan montar los recipientes de acero inoxidable con 30 cm de altura. Se sugiere este material por su resistencia, no guarda olores y su facilidad para limpiar.

7.4.3 Muestras para entrenamiento

La línea celular B16F10 (*mus musculus* células de piel de melanoma) puede ser utilizada como muestra objetivo. Esta es cultivada en frascos de cultivo celular de 25 cm² con 4 ml de medio de cultivo celular DMEM. Cuando la caja de cultivo alcanza una confluencia por encima del 80% (4 millones de células aproximadamente) puede ser usada en la sesión de entrenamiento y después del entrenamiento desechada.

La manipulación de las cajas de cultivo celular debe ser con guantes de nitrilo sin talco tanto en el laboratorio como en la sesión del entrenamiento.

7.4.4 Número de cajas necesarias para el entrenamiento

2 cajas de cultivo por perro para la fase de inducción para cada sesión.

1 caja de cultivo por perro para la fase de fijación y discriminación por sesión.

7.4.5 Duración y almacenamiento de las muestras

Las cajas de cultivo confluentes pueden ser almacenadas en refrigeración a 4 °C por 16 horas.

La duración del entrenamiento con la caja de cultivo no debe rebasar los 20 minutos.

Si el lugar de entrenamiento está alejado la muestra se puede transportar en refrigeración (hasta 3 horas), en una hielera con geles refrigerantes, las condiciones óptimas de temperatura son de 4-15 °C, temperaturas fuera de este rango pueden afectar la viabilidad de las células.

7.4.6 Preparación y manejo de las muestras

Asegurarse que las células B16F10 estén en fase de crecimiento logarítmico antes de comenzar la fase de entrenamiento.

- 1.- Mantener el doble de cajas de cultivo celular necesarias para el entrenamiento en la incubadora con 40-50 % de confluencia e incubar por 24 horas.
- 2.- Tomar las cajas que se utilizaran en el entrenamiento con mayor confluencia (encima del 80%) y colocarles un papel parafilm en la tapa para evitar el escape de gases.
- 3.- Colocar las cajas de cultivo con parafilm dentro de bolsas Ziploc® y mantenerlas en refrigeración hasta utilizarlas en la sesión de entrenamiento.
- 4.- Realizar a las cajas restantes un pase de 1:2 para tener la misma cantidad de cajas para el día siguiente.
- 5.- Para iniciar la sesión de entrenamiento sacar las cajas de cultivo de refrigeración y colocarlas en los recipientes.
- 6.- Terminada la sesión de entrenamiento se coloca la tapa a la caja de cultivo y se guarda en la bolsa Ziploc® para que en el laboratorio la caja sea lavada y desinfectada con una solución de cloro al 10% y después depositada en una bolsa de RPBI.

7.4.7 Controles y distractores

Medio DMEM con las mismas características utilizado para cultivar la línea de melanoma murino, se conserva en refrigeración.

Cajas de cultivo celular de 25 cm² estériles.

Ratones de laboratorio de la cepa C57BL6, 4 hembras y 4 machos mayores a 8 semanas de edad, alojados en bioterio en un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad y alimentados con comida para roedores junto con agua *ad libitum*.

7.4.8 Entrenamiento

Utilizar la técnica de moldeo libre y captura de comportamiento, en las tres fases del entrenamiento (Inducción, fijación y discriminación)

Realizar 2 sesiones de entrenamiento por día con una duración de 10-15 minutos cada una, en cada sesión dar la ración de croquetas destinada para su alimentación.

Entrenar 5 días seguidos sin interrupción y descansar 2, por ejemplo de lunes a viernes y descansar sábado y domingo.

7.4.9 Fase de inducción

Duración: Aproximadamente 7 días

2 sesiones por día

1.- Colocar en una mesa la base de fierro y encima de la base se monta un recipiente de acero inoxidable, dentro del recipiente se acomodan 2 cajas de cultivo celular, se retira la tapa de las cajas de cultivo y sobre ellas se sobrepone el recipiente de acero inoxidable perforado con los agujeros orientados hacia donde está la boca de las cajas de cultivo para permitir el paso del aroma de las cajas a través de los orificios.

2.- Colocar la base con los recipientes y las cajas de cultivo ya montadas en el suelo y se trae al perro al área de trabajo.

3.- Esperar a que el perro se acerque a la muestra y la olfatee por sí mismo sin darle indicaciones, cuando el perro acerque su nariz al recipiente se hace clic y se premia con croquetas en el recipiente cerca de los orificios.

4.- El entrenador se debe mover a lo largo del área de trabajo, por delante, detrás o por lo costados del perro cuando este se encuentre olfateando la muestra directamente en los orificios para premiar.

5.- El entrenador refuerza el tiempo que transcurra oliendo el recipiente premiando con más croquetas así como también cuando escuche resoplar al perro.

6.- Continuar premiando hasta terminar la ración de alimento sin pasarse de 15 minutos.

7.4.10 Criterio para pasar a la siguiente fase

Después de 7 días el perro se mantiene oliendo la muestra directamente en los orificios del recipiente sin hacer contacto con el entrenador, permaneciendo anclado.

En caso de que el perro aun no sea capaz de mantenerse oliendo la muestra o no mostrar interés se extiende el periodo por 7 días más, si después de ese tiempo sigue sin haber mejoría se debe descartar al perro.

7.4.11 Fase de fijación.

Duración: aproximadamente 14 días

Tiempo por sesión: 10-15 minutos

2 sesiones por día.

1.- Preparar 3 recipientes montados de la misma forma que en la fase de inducción, 2 estarán vacíos y 1 contendrá una caja de cultivo celular como muestra objetivo.

2.- Alinear los recipientes separados por $\frac{1}{2}$ metro de distancia entre uno y otro y a 3 metros del entrenador.

3.- Traer al perro al área de trabajo y dar la orden de sentado, ya que se tiene la atención del perro dar la orden de “busca” y señalar con el brazo extendido los recipientes.

4.- Cuando el perro se acerque a olfatear el recipiente con la muestra objetivo hacer clic y premiar con croquetas dentro del recipiente.

5.- Golpear los otros recipientes vacíos mientras come para llamar su atención, pero no premiar.

6.- Esperar a que el perro termine de comer las croquetas para llamarlo de vuelta para cambiar de posición los recipientes sujetándolos desde la base así como su alineación, esta puede ser en diagonal, rectangular, circular, en cruz etc.

7.- Repetir el ejercicio hasta terminar las croquetas de su ración y dar por terminada la sesión.

8.- Repetir los pasos anteriores pero cambiando los recipientes perforados por recipientes con tapa y aumentando la cantidad de insertos, hasta que el perro sea capaz de mantenerse fijado en la muestra objetivo e ignorar los recipientes vacíos.

7.4.12 Ejercicios de especificidad

1.- Colocar 10 recipientes vacíos sin muestra objetivo.

2.- Dar la orden de búsqueda

3.- El perro debe oler todos los recipientes.

4.- Hacer clic después de que los haya olido todos y no se haya fijado en ninguno.

5.- Premiar con croquetas.

7.4.13 Criterios para pasar a la fase de discriminación

Cuando el perro no falle en identificar la muestra objetivo entre 9 recipientes vacíos, y su marcaje sea correcto se inicia la fase de discriminación esta fase no debe tomar más de 2 semanas.

7.4.14 Fase de discriminación

Duración: Aproximadamente 22 días

2 sesiones por día

Tiempo por sesión: 12-15 minutos

Rondas por sesión: 25

1.- Montar 6 recipientes con sus respectivas bases y tapas, un recipiente contendrá la muestra objetivo (una caja de cultivo con células) 1 recipiente más contendrán caja de cultivo celular vacía, y las restantes estarán vacías.

2.- Llamar al perro al lugar de trabajo y dar el comando de búsqueda, cuando identifique correctamente la muestra objetivo hacer clic y premiar al perro.

3.- Cambiar la posición de los recipientes para reiniciar el ejercicio y así sucesivamente hasta terminar la sesión.

Si 2 días seguidos el perro identifica correctamente la muestra objetivo se agrega un nuevo distractor.

4.- Añadir además de la muestra objetivo y la caja de cultivo celular vacía, 4 ml de medio de cultivo celular depositado en 2 cajas Petri de plástico (100x15 mm), dentro de 2 recipientes el ejercicio se realiza de la misma manera que en los pasos 2 y 3.

5.- Continuar entrenando de la misma manera hasta que el perro sea capaz de discriminar los distractores e identificar la muestra en el 100% de las rondas de cada sesión.

6.- Cuando el perro haya superado el paso 5, continuar con los siguientes distractores.

Colocar 6 recipientes (1 recipiente con la muestra objetivo, 2 con medio DMEM sin células, 2 con 1 ratón de la cepa C57/BL6 y un recipiente vacío).

Continuar entrenando en los siguientes días de la misma manera hasta alcanzar 100% de precisión identificando la muestra objetivo.

*Reiniciar el ejercicio en caso de que el perro muestre mucho interés en los recipientes con el ratón.

7.4.15 Última etapa de la fase de discriminación

Comenzar esta etapa cuando el perro alcance un 100% de precisión.

Una sesión por día.

En esta etapa el entrenamiento se realiza al aire libre.

Utilizar cajas de cultivo celular con células pero sin medio DMEM como muestra objetivo.

1.- Colocar la muestra objetivo en un recipiente y cubrirlo con otro perforado, agregar 3 recipientes vacíos y un ratón en su jaula sin limpiar.

2.- Traer al perro al área de trabajo y dar el comando de búsqueda.

3.- Hacer clic y premiar dentro del recipiente con croquetas cada que el perro identifique la muestra objetivo e ignore al ratón, continuar el ejercicio hasta terminar el alimento.

4.- Al día siguiente colocar de nuevo los recipientes al igual que en el paso 1 pero sustituyendo la jaula sin limpiar del ratón por un recipiente con el ratón dentro.

7.- Repetir el ejercicio premiando fuera del recipiente los días siguientes hasta lograr una tasa de éxito de detección del 100% de las rondas realizadas.

En caso de no alcanzar la tasa de éxito se debe reiniciar de nuevo el entrenamiento desde la inducción, fijación y discriminación con 7 días cada una. De continuar con bajo rendimiento descartar al perro o tratar de identificar factores intrínsecos del perro que pudieran afectar su desempeño (enfermedad, estrés, estado de preñez o celo).

Cuando se alcanza la tasa de éxito deseada se dice que el perro está listo para realizar una evaluación de detección de melanoma en un modelo murino.

8. DISCUSIÓN

La capacidad de memorizar un gran número de muestras de olores individuales utilizadas en el proceso de entrenamiento, junto con una mala generalización del aroma objetivo, puede hacer que un perro ignore muestras nuevas de pacientes con cáncer (Jezierski et al., 2015). Las líneas celulares disminuyen la variabilidad de muestra a muestra y elimina la presencia de señales olfatorias confusas específicas del paciente (Murarka et al., 2019).

En este estudio, 2 de 3 perros que iniciaron el entrenamiento para la identificación de la línea celular de cáncer fueron capaces de completarlo y pasar a la fase experimental; en lo reportado por Yoel et al., (2015), Schallschmidt et al., (2015) y Seo et al., (2018) cuyo objetivo era entrenar perros para detectar los compuestos volátiles producidos por diferentes líneas celulares, todos los perros que comenzaron el entrenamiento lograron completarlo por otro lado en el trabajo de Murarka et al., (2019) de los 3 perros que iniciaron, 1 fue capaz de completar las diferentes fases del entrenamiento. Por lo tanto nuestro estudio da soporte a lo enunciado por Yoel et al., (2015) en el que señalan que las líneas celulares poseen un aroma único que hace posible su identificación a través del olfato canino con un entrenamiento adecuado. Sin embargo, en nuestro estudio y el de Murarka et al., (2019) había perros que no fueron capaces de completar el entrenamiento e identificar la línea celular, al igual que ellos los perros que fueron descartados se debió a su comportamiento y carácter más que un tema de falta de sensibilidad en su nariz o a la raza. Cabe señalar el hecho que los perros utilizados en nuestro experimento no fueron seleccionados desde cachorros, y contaban con entrenamiento previo para la detección de otras sustancias, el estudio de Svobodová et al., (2008) revelan que el comportamiento idóneo de un perro policía adulto puede predecirse por su rendimiento como cachorros mediante el uso de pruebas de aptitud especiales, por otro lado, Lit & Crawford, (2006) describen que los perros de rescate entrenados para identificar el aroma de personas vivas y cadáveres mostraron un desempeño inferior a los de los perros entrenados solo para el olor de personas vivas. Se necesita investigación adicional para determinar si las capacidades olfativas específicas de los perros están correlacionadas con la edad, tipo o entrenamiento previo, polimorfismo genético, raza, clima, o si el rendimiento olfativo es más una función de atributos de comportamiento como la motivación inherente (es decir, el impulso) y la capacidad de ser entrenados (Jenkins et al., 2018).

Los resultados de sensibilidad y especificidad de las 3 pruebas realizadas por ambos perros fue por encima del 97% este resultado es similar al obtenido por Yoel et al., (2015) este estudio arrojó un 100% sensibilidad para ambos perros entrenados para identificar la línea celular MCF7 de cáncer de mama, utilizando platos de cultivo celular con 10^6 de células en la etapa de entrenamiento y evaluación, Seo et al., (2018) por su parte obtuvieron una sensibilidad del 94% en la detección de cáncer de mama (4T1) y colon (CT26) murino utilizando únicamente los desechos celulares presentes en el medio de cultivo, Murarka et al. (2019) utilizó papel filtro colocado sobre las cajas de cultivo celular para cáncer ovárico, que eran retiradas después de 24 horas, para el entrenamiento canino y los resultados de las pruebas experimentales fueron una sensibilidad del 100%. En contraparte, el estudio de Schallschmidt et al. (2015) ponen en duda la capacidad de perros entrenados para detectar líneas celulares de cáncer de pulmón, en su experimento, el perro 1 obtuvo una sensibilidad del 20% mientras que el perro 2 del 10%, sin embargo, las muestras utilizadas en el entrenamiento y las pruebas fueron los gases extraídos de las cajas de cultivo celular con una jeringa especial y colocadas en un tubo que contenía vellón de polipropileno con un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico. Los resultados de sensibilidad de estos experimentos pueden estar influidos por el tipo de muestras y posterior manipulación, aun no existe una estandarización para la cuantificación e identificación de todos los VOCs presentes en el cultivo celular o las muestras utilizadas en el entrenamiento de forma precisa, por lo que se desconoce si los VOCs presentes en el espacio de cabeza de las cajas de cultivo celular se ven alterados en la toma de muestra, almacenamiento o en el momento en que son utilizadas, es probable que los gases almacenados en el tubo con la gasa escaparan al momento de utilizarlos en el entrenamiento a diferencia del uso de las cajas de cultivo celular que contiene a las células vivas produciendo VOCs. Otro motivo por el que quizás el estudio de Schallschmidt et al., (2015) haya obtenido una sensibilidad muy baja, es debido a que al final del entrenamiento la sensibilidad y especificidad solo era del 80% previo a la prueba de detección, mientras que el estudio realizado por nosotros el parámetro era del 95% de sensibilidad para pasar a la fase experimental. Por lo que parámetros menos rigurosos podrían propiciar desempeños de detección pobres.

Los resultados obtenidos en las primeras pruebas de detección de melanoma en un modelo murino, fueron ligeramente mejores que las realizadas meramente al azar. Coyota obtuvo una sensibilidad del 42% (3/7) y Cheeto una sensibilidad del 30% (3/10). El estudio de Willis et al., (2016) también obtuvo un resultado parecido, el perro entrenado para detectar muestras de melanoma, recolectadas haciendo presión con una gasa de algodón sobre lesiones de pacientes enfermos entre muestras control de personas sanas, nevos benignos y carcinoma basal; el perro obtuvo una sensibilidad del 45% vs el 10% de desempeñarlo de forma aleatoria, una posible causa de ese resultado puede ser la diversidad de las muestras que pudiera provocar una superposición en las emisiones de VOCs entre las lesiones melanocíticas que muestran el espectro completo de anomalía celular, desde displasia leve hasta malignidad invasiva lo que provoca dificultad en el perro de encontrar un común denominador y generalizar el aroma de melanoma. En nuestro trabajo pudiera haber ocurrido un proceso similar en donde en el entrenamiento al efectuarse con solo células de melanoma el perro entró en un proceso de especialización por lo que podría ser la causa en que fallara en encontrar un común denominador presente en un ratón inoculado, ya que nunca había estado en contacto con ese aroma que podría encontrarse modificado al ser un modelo *in vivo* (Moser et al, 2019). Estos datos contrastan con los de Pickel et al., (2004) que realizaron un entrenamiento con muestras de tejido de melanoma para una posterior identificación en personas sospechosas, el perro A obtuvo 6/7 personas detectadas y el perro B 3/4, esto sugiere que a pesar de que tanto el cultivo celular, las muestras recolectadas con algodón y el tejido tumoral emiten señales volátiles para su identificación, el uso de tejido tumoral en el entrenamiento para la posterior identificación *in vivo* arrojó mejores resultados.

Cuando los perros desempeñaron la primera prueba del modelo murino, observamos que en la primera ronda no marcó la muestra objetivo, pero el tiempo que pasaban oliendo las muestras era ligeramente mayor en comparación con las rondas realizadas en el entrenamiento previo aunado a un comportamiento de indecisión para indicar la muestra objetivo de forma determinante, Concha et al., (2014) encontraron que la duración del olfateo en los verdaderos negativos es significativamente más corta que en los falsos negativos, verdaderos positivos y falsos positivos. Por lo tanto, los perros solo realizaron un episodio de olfateo hacia verdaderos negativos, pero 2 episodios ocurrieron

comúnmente en las otras situaciones, esto sugiere que existe la presencia de un aroma similar en común entre el ratón inoculado y las células de melanoma.

La detección de melanoma a través de muestras de heces y orina fue inferior a la realizada al azar con visibles titubeos, este resultado es semejante al de Murarka et al., (2019) en su estudio al igual que el nuestro trató de demostrar si el entrenamiento con una línea celular de cáncer (ovario) podría permitir al perro identificar cáncer a través de una matriz diferente (plasma); a pesar de que los resultados no fueron los esperados, observaron un comportamiento en el perro que sugiere que su vacilación en los nuevos olores del cáncer (línea celular y plasma) fue más probable debido a cierta similitud con su olor entrenado, mientras que la ausencia de una respuesta se debió a su diferencia. Esto podría ser debido a que los diferentes fluidos biológicos tienden a presentar mayor o menor concentración de VOCs y diferentes grupos de compuestos que los que se presentan en el espacio de cabeza de las líneas celulares (Schmidt & Podmore, 2015). Otra causa subyacente del bajo rendimiento es subestimar los efectos de la matriz. Si bien es cierto que el olor es el objetivo que se está identificando o rastreando, la matriz que rodea al material influirá en ese olor y determinará con qué precisión el perfil de un olor imita al del material verdadero. El aroma interactuará con la matriz debido a las propiedades químicas de la misma. La presión de vapor, las tasas de evaporación y sublimación, la polaridad, las tasas de difusión, la solubilidad y el peso molecular influirán cada una en las propiedades de transporte de cómo un aroma se mueve a través y se libera de su matriz. No hay una matriz que sea apropiada para todos los aromas (Simon et al., 2020).

Los estudios realizados para la detección de cáncer que utilizaban el mismo tipo de muestra en el entrenamiento y en la fase experimental mostraron mejores resultados como el realizado por Rodionova et al., (2014), ellos utilizaron muestras de heces y orina de ratones inoculados con Carcinoma Hepatocelular y en 27 de 30 experimentos el olor de las heces del animal enfermo fue detectado (sensibilidad 90%) y en 45 de las 66 pruebas con orina el cáncer fue detectado correctamente (76.8%).

En cuanto a la hipótesis de esta investigación podemos señalar que esta se cumple parcialmente, basados en nuestros resultados el entrenamiento con la línea celular le permitió identificar al ratón con melanoma ligeramente mejor que el realizado meramente

al azar, nosotros esperábamos una sensibilidad por encima del 90%, sin embargo, su comportamiento nos indicó que existía un aroma similar entre las células de melanoma y el de un ratón inoculado, después de la primera prueba se realizó una segunda en donde los perros arrojaron mejores resultados, creemos que esta segunda prueba fue más una reafirmación del olor, que a través de una retroalimentación positiva el perro aprendió a generalizar, por lo que un cambio radical de identificación *in vitro* a un modelo *in vivo* no es recomendable, no obstante, el entrenamiento con la línea celular B16F10 puede servir como una forma de inducción del aroma de cáncer que después se puede ir sensibilizando con mayor variedad de muestras y tejidos para que el perro aprenda a generalizar el aroma del cáncer (Moser et al., 2019).

9. CONCLUSIONES

El protocolo de entrenamiento utilizando la línea celular B16F10 nos permite obtener perros capaces de detectar el aroma producido por las células de melanoma *in vitro*.

Los resultados de sensibilidad en la detección de melanoma *in vivo* sugieren que no es recomendable un cambio radical de la detección *in vitro* a un modelo *in vivo*.

El comportamiento de los perros sugiere que existe la presencia de un aroma en común entre la línea celular y las muestras biológicas.

Este protocolo ofrece la posibilidad de servir como material de inducción de aroma de melanoma, por lo que tiene un gran potencial para contribuir en la búsqueda de nuevos métodos de entrenamiento canino para la detección de cáncer.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Amundsen T, Sundstrom S, Buvik T, Gederaas OA, Haaverstad R. 2014. Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer. *Acta Oncologica* 53:3 307–315.
2. Angle C, Waggoner LP, Ferrando A, Haney P, Passler T. 2016. Canine detection of the volatilome: A review of implications for pathogen and disease detection. *Frontiers in Veterinary Science*, 3 JUN, 1–7.
3. Arenas, R. 2015. *Dermatologia, atlas diagnostico y tratamiento*, P. Ledezma, (eds). Mc Graw Hill Interamerica: Mexico
4. Arnold M, De Vries E, Whiteman DC, Jemal A, Bray F, Parkin DM, Soerjomataram I. 2018. Global burden of cutaneous melanoma attributable to ultraviolet radiation in 2012. *International Journal of Cancer*, 143:6, 1305–1314.
5. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1-31
6. Azoury SC, Lange JR. 2014. Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma. *Surgical Clinics of North America* 94:945–962.
7. Barrios AW, Sánchez-Quinteiro P, Salazar I. 2014. Dog and mouse: Toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Frontiers in Neuroanatomy* 8:1–7.
8. Benjamin I J, 2010. *Molecular Basis of Human Disease*. Coleman W, Tsongalis G (eds.), Springer: New York. pp. 2-14.
9. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Wright WE. 1998. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279:349-352.
10. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68:394–424.
11. Broom DM, Neal DE, Elliker KR, Williams HC, Armstrong S, Sommerville BA. 2014. Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer

- odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC Urology*, 14(1).
12. Buljubasic F, Buchbauer G. 2015. The scent of human diseases: a review on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. *Flavour and Fragrance Journal*, 30: 5–25.
 13. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MRJ, Speirs V. 2003. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5:89–95.
 14. Cain DP. 1974. The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychological Bulletin*, 81:654–671.
 15. Campbell LF, Farmery L, George SMC, Farrant PB J. 2013. Canine olfactory detection of malignant melanoma. *BMJ Case Reports* 1-3.
 16. Church J, Williams H. 2001. Another sniffer dog for the clinic? *The Lancet*, 358:930.
 17. Concha A, Mills DS, Feugier A, Zulch H, Guest C, Harris R, Pike TW. 2014. Using sniffing behavior to differentiate true negative from false negative responses in trained scent-detection dogs. *Chemical Senses* 39:749–754.
 18. Cornu JN, Cancel-Tassin G, Ondet V, Girardet C, Cussenot O. 2011. Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: A step forward in early diagnosis. *European Urology* 59:197–201.
 19. Craven BA, Paterson EG, Settles GS. 2009. The Fluid Dynamics of Canine Olfaction: A New Explanation for Macrosmia. *Science* 933–943.
 20. Cura MJ, Sarmiento KYC, Luz M, Garlatti B, Gallo F, Vasconcelos RMR, Mazzuocolo LD. 2018. Importancia del seguimiento de lesiones melanocíticas con dermatoscopia digital para el diagnóstico temprano de melanoma. *Rev. Hosp. Ital. B.Aires*, 38:105–109.
 21. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews* 29:309–316.
 22. Dorman D, Foster M, Fernhoff K, Hess P. 2017. Canine scent detection of canine cancer: a feasibility study. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 8:69–76.
 23. Dvorak HF. 2015. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunology*

Research 3:1–11.

24. Ehmann R., Boedeker E, Friedrich U, Sagert J, Dippon J, Friedel G, Walles T. 2012. Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: Revisiting a puzzling phenomenon. *European Respiratory Journal* 39:669–676.
25. Ferris LK, Harris RJ. 2012. New Diagnostic Aids for Melanoma. *Dermatologic Clinics* 30:535–545.
26. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. 2012. Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine* 18:509–515.
27. Friedman RJ, Gutkowitz-Krusin D, Farber MJ, Warycha M, Schneider-Kels L, Papastathis N, Tsao H. 2008. The Diagnostic Performance of Expert Dermoscopists vs a Computer-Vision System on Small-Diameter Melanomas. *Archives of Dermatology* 144:476–482.
28. Furton KG, Caraballo NI, Cerreta MM, Holness HK. 2015. Advances in the use of odour as forensic evidence through optimizing and standardizing instruments and canines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370:1674.
29. Furton KG, Myers LJ. 2001. The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta* 54:487–500.
30. GLOBOCAN. 2018. Mexico fact sheets. Retrieved from International Agency For Research on Cancer [Online] Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
31. Gordon RT, Schatz CB, Myers LJ, Kosty M, Gonczy C, Kroener J, Zaayer J. 2008. The use of canines in the detection of human cancers. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 14:61–67.
32. Guerrero-Flores H, Apresa-García T, Garay-Villar Ó, Sánchez-Pérez A, Flores-Villegas D, Bandera-Calderón A, Salcedo M. 2017. A non-invasive tool for detecting cervical cancer odor by trained scent dogs. *BMC Cancer* 17:1–8.
33. Gutzwiller KJ. (1990). Minimizing dog-induced biases in game bird research. *Wildlife Society Bulletin* 18: 351–356.
34. Hackner K, Errhalt P, Mueller MR, Speiser M, Marzluf BA, Schulheim A, Doll T. 2016. Canine scent detection for the diagnosis of lung cancer in a screening-like

- situation. *Journal of Breath Research* 10:4.
35. Hakim M, Broza YY, Barash O, Peled N, Phillips M, Amann A, Haick H. 2012. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews* 112:5949–5966.
 36. Hall NJ, Glenn K, Smith DW, Wynne CDL. 2015. Performance of Pugs, German Shepherds, and Greyhounds (*Canis lupus familiaris*) on an odor-discrimination task. *Journal of Comparative Psychology* 129:237–246.
 37. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The Hallmarks of Cancer Review. *Cell* 100:57–70.
 38. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 146:646–674.
 39. Harrington K. J. 2016. The biology of cancer. *Medicine (United Kingdom)* 44:1–5.
 40. Hawkes CH, Doty RL. 2009. The neurology of olfaction. *The Neurology of Olfaction* 1: 252.
 41. Herrera-González N, Aco Flores A. 2010. El melanoma en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15:161–164.
 42. Horvath G, Andersson H, Nemes S. 2013. Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: A retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. *BMC Cancer* 13:1-7
 43. Horvath G, Andersson H, Paulsson G. 2010. Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 10:643.
 44. Horvath G, Järverud GAK, Järverud S, Horváth I. 2008. Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integrative Cancer Therapies* 7:76–80.
 45. Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078.
 46. Jamieson LT, Baxter GS, Murray PJ 2017. Identifying suitable detection dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 195: 1-7
 47. Janfaza S, Khorsand B, Nikkhah M, Zahiri J. 2019. Digging deeper into volatile organic compounds associated with cancer. *Biology Methods and Protocols* 4: 1–11.

48. Jenkins EK, DeChant MT, Perry EB. 2018. When the nose doesn't know: Canine olfactory function associated with health, management, and potential links to microbiota. *Frontiers in Veterinary Science* 5:1-16.
49. Jezierski T. 2016. *Canine Olfaction Science and Law*, Ensminger J (eds). CRC Press: Boca Raton pp. 516.
50. Jezierski T, Adamkiewicz E, Walczak M, Sobczyńska M, Górecka-Bruzda A, Ensminger J, Papet E. 2014. Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic Science International* 237: 112–118.
51. Jezierski T, Walczak M, Ligor T, Rudnicka J, Buszewski B. 2015. Study of the art: canine olfaction used for cancer detection on the basis of breath odour. Perspectives and limitations. *Journal of Breath Research* 9:027001.
52. Johnen D, Heuwieser W, Fischer-Tenhagen C. 2013. Canine scent detection-Fact or fiction? *Applied Animal Behaviour Science*, 148: 201–208.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.002>
53. Johnston J. 1999. *Canine Detection Capabilities: Operational Implications of Recent R&D Findings*. In Auburn University.
54. Lesniak A, Walczak M, Jezierski T, Sacharczuk M, Gawkowski M, Jaszczak K. 2008. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. *Journal of Heredity* 99: 518–527.
55. Lit L, Crawford CA. 2006. Effects of training paradigms on search dog performance. *Applied Animal Behaviour Science*, 98(3–4), 277–292.
56. Lubes G, Goodarzi M. 2018. GC–MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147:313–322
57. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Creagan ET. 2007. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings* 82:364–380.
58. Martínez JD, Herrera LA. 2006. Angiogenesis: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología* 1:83–96.

59. Martinez-Said H, Cuellar-Hubbe M, Barrón-Velasquez E, Padilla RA, Herrera-Gomez A, Lopez-Graniel C, Mohar-Betancourt A. 2004. Epidemiology of cutaneous melanoma in México(1980-2002). *Eur J Surg Oncol* 4:11–13.
60. McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. 2006. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integrative Cancer Therapies* 5:30–39.
61. Meyer LE, Otberg N, Sterry W, Lademann J. 2006. In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin. *Journal of Biomedical Optics* 11:044012.
62. Mordoh, A. 2009. Clínica del melanoma Clinical manifestations of melanoma. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 43: 327–331.
63. Moser AY, Bizo L, Brown WY. 2019. Olfactory generalization in detector dogs. : 1–12.
64. Murarka M, Vesley-Gross Z I, Essler JL, Smith PG, Hooda J, Drapkin R, Otto CM. 2019. Testing ovarian cancer cell lines to train dogs to detect ovarian cancer from blood plasma: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 1–7.
65. Ochoa FJ, Ramón J, Hernández-Ayala F, Márquez-Rivera H, Arana-Rivera E, Martínez-Ávalos A. 2005. Melanoma: motivo de encuentro interdisciplinario de expertos. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 4: 9–32.
66. Overall KL.2011. That dog is smarter than you know: advances in understanding canine learning, memory, and cognition. *Top Companion Anim Med*. 26: 2-9.
67. Pickel D, Manucy GP, Walker DB, Hall SB, Walker JC. 2004. Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Applied Animal Behaviour Science* 89:107–116.
68. Pirrone F, Albertini M. 2017. Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: A systematic review of the literature. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 19: 105–117.
69. Polgár Z, Kinnunen M, Újváry D, Miklósi Á, Gácsi M. 2016. A test of canine olfactory capacity: Comparing various dog breeds and wolves in a natural detection task. *PLoS ONE*, 11: 1–14.
70. Potter M, Newport E, Morten KJ. 2016. The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44:1499–1505.

71. Reep RL, Finlay BL, Darlington RB. 2007. The limbic system in mammalian brain evolution. *Brain, Behavior and Evolution* 70:57–70.
72. Rodionova EI, Kochevalina MY, Kotenkova EV, Morozova OV, Kogun GA., Bataeva EL, Ambaryan AV. 2014. Detection of Volatile Organic Compounds Associated with Hepatocellular Carcinoma by Macrosmatic Animals: Approaches to the Search for New Tumor Markers. *Biology Bulletin* 42:239–245.
73. Rosa M, Vidrio G, Lozano NC. 2007. Confrontando al melanoma en el siglo XXI. *Medigraphic* 35:3–13.
74. Schallschmidt K, Becker R, Zwaka H, Menzel R, Johnen D, Fischer-Tenhagen C, Nehls I. 2015. In vitro cultured lung cancer cells are not suitable for animal-based breath biomarker detection. *Journal of Breath Research* 9:1-12
75. Schmerling RA, Loria D, Cinat G, Ramos WE, Cardona AF, Sánchez JL, Buzaid AC. 2011. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. *Revista Panamericana de Salud Publica* 30:431–438.
76. Schmidt K, Podmore I. 2015. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers* 1–16.
77. Sen Majumder S, Bhadra A. 2015. When love is in the air: Understanding why dogs tend to mate when it rains. *PLoS ONE*, 10:1–15.
78. Seo IS, Lee HG, Koo B, Koh CS, Park HY, Im C, Shin HC. 2018. Cross detection for odor of metabolic waste between breast and colorectal cancer using canine olfaction. *PLoS ONE* 13:1–9.
79. Shirasu M, Touhara K. 2011. The scent of disease: Volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *Journal of Biochemistry*, 150:257–266.
80. Simon A, Lazarowski L, Singletary M, Barrow J, Van Arsdale K, Angle T, Giles K. 2020. A Review of the Types of Training Aids Used for Canine Detection Training. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:1–10.
81. Smith TD, Conover MR. 2007. Predator-Prey Dynamics: The Role of Olfaction. *Journal of Mammalogy* 89:791.
82. Sonoda H, Kohnoe S, Yamazato T, Satoh Y, Morizono G, Shikata K, Maehara Y. 2011. Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection.

Gut, 60:814–819.

83. Svobodová I, Vápeník P, Pinc L, Bartoš L. 2008. Testing German shepherd puppies to assess their chances of certification. *Applied Animal Behaviour Science*, 113(1–3), 139–149.
84. Tacher S, Quignon P, Rimbault M, Dreano S, Andre C, Galibert F. (2005). Olfactory receptor sequence polymorphism within and between breeds of dogs. *Journal of Heredity* 96:812–816.
85. Taverna G, Tidu L, Grizzi F, Torri V, Mandressi A, Sardella P, Graziotti P. 2015. Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *Journal of Urology*, 193:1382–1387.
86. Thuleau A, Gilbert C, Bauër P, Alran S, Fourchette V, Guillot E, Fromantin I. 2018. A new transcutaneous method for breast cancer detection with dogs. *Oncology (Switzerland)*, 96: 110–113.
87. Uemura E. 2015. *Fundamentals of Canine Neuroanatomy and Neurophysiology*. (1era ed.). Danvers: Wiley Blackwell.
88. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* , 324: 1029–1033.
89. Walczak M, Jezierski T, Górecka-Bruzda A, Sobczyńska M, Ensminger J. 2012. Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 7:283–294.
90. Walker DB, Walker JC, Cavnar PJ, Taylor JL, Pickel DH, Hall SB, Suarez JC. 2006. Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 97: 241–254.
91. Warburg, O. (1931). The metabolism of tumours. Investigations from the Kaiser-Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. *BJS*, 19:168.
92. Weber CM, Cauchi M, Patel M, Bessant C, Turner C, Britton LE, Willis CM. 2011. Evaluation of a gas sensor array and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace. *The Analyst*, 136:359–364.
93. Williams H, Pembroke A. 1989. SNIFFER DOGS IN THE MELANOMA

CLINIC? The Lancet, 333: 734.

94. Williams M, Johnston JM. 2002. Training and maintaining the performance of dogs (*Canis familiaris*) on an increasing number of odor discriminations in a controlled setting. *Applied Animal Behaviour Science*, 78:55–65.
95. Willis CM, Britton LE, Swindells MA, Jones EM, Kemp AE, Muirhead NL, Ali M. 2016. Invasive melanoma in vivo can be distinguished from basal cell carcinoma, benign naevi and healthy skin by canine olfaction: a proof-of-principle study of differential volatile organic compound emission. *British Journal of Dermatology* 175:1020–1029.
96. Willis CM., Britton LE, Harris R, Wallace J, Guest CM. 2010. Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs. *Cancer Biomarkers* 8:145–153.
97. Willis CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, Church JCT. 2004. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 329:712.
98. Wu Y, Zhou BP. 2009. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* 8:3267–3273.
99. Yao Y, Dai W. 2014. Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 5:1000165.
100. Yoel U, Gopas J, Ozer J, Peleg R, Shvartzman P. 2015. Canine scent detection of volatile elements, characteristic of malignant cells, in cell cultures. *Israel Medical Association Journal*, 17:567–570.